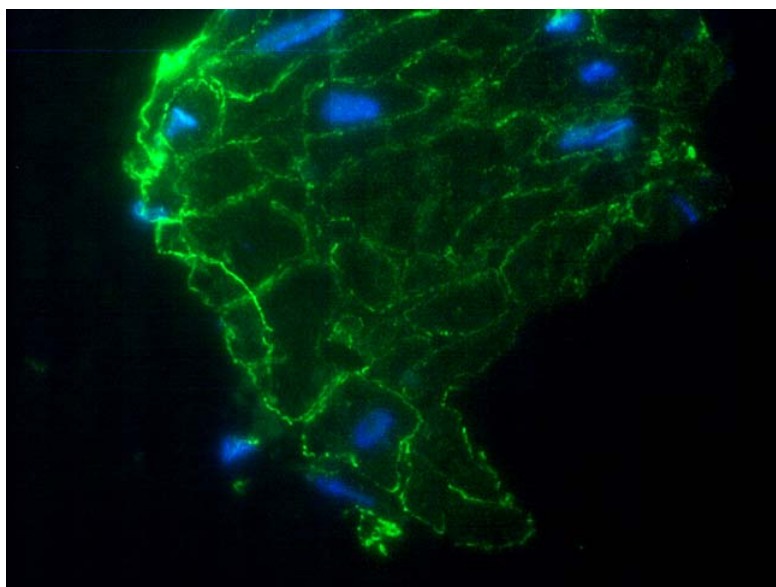


DOKTORI ÉRTEKEZÉS

2005

NTPDÁZOK ÉS KAVEOLÁK



KITTEL ÁGNES

MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet
Gyógyszerkutató Osztály



TARTALOM

BEVEZETÉS	2
CÉLKITŰZÉS	13
ANYAGOK és MÓDSZEREK	14
AZ EREDMÉNYEK és MEGBESZÉLÉSÜK	
EKTO-ATPÁZOKTÓL az NTPDÁZOKIG	26
KAVEOLÁK, EKTO-ATPÁZ AKTIVITÁS, NTPDÁZOK	57
ÖSSZEGZÉS	93
IRODALOM	96
AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ SAJÁT KÖZLEMÉNYEK	107

BEVEZETÉS

A sejtek közötti jelátviteli-jelátalakítási folyamatok megértése az egyik legfontosabb feladat az élettani alapkutatások terén. A hetvenes évek elején Burnstock munkái hívták fel a figyelmet arra, hogy ezekben a folyamatokban az extracelluláris nukleotidoknak is szerepe van ¹. A purinok és pirimidinek sejtekre gyakorolt hatásának tanulmányozása vezetett a purinerg hipotézis megalkotásához és a purin jelátvitelben résztvevő purinoceptorok és ektonukleotidázok azonosításához, leírásához. Kísérletek bizonyították, hogy majdnem minden sejtől felszabadul több-kevesebb adenin nukleotid, különösen gyulladások, ischémiás folyamatok során ²⁻¹¹. A minket leginkább érdeklő ATP-t szekretálhatják neuroendokrin-, krómaffin-, endotél- és hízósejtek, purinerg neuronok és vérlemezkék ¹², és szállíthatja belső plazmamembrán fehérje ^{13,14} is. A központi idegrendszerben az ATP az ideg- és gliasejtjeiben együtt tárolódik más ingerületátvivő anyagokkal és ingerület hatására velük együtt kerül a sejtek közötti térbe. Így találták meg acetilkolin ¹⁵ és katekolaminok ^{16,17} mellett. Az extracelluláris ATP koncentrációjának szabályozása, szinten tartása nemcsak azért fontos, mert az ATP kb. 100 μM felett már elpusztítaná a sejteket, de azért is, mert P2 purinerg receptorokhoz kötődve jelátviteli folyamatokat szabályoz. Amennyiben pl. patológiás folyamatok hatására az élettanilag szükségesnél több ATP szabadul fel, az a szívben a P2 receptorok közvetítésével fokozott norepinefrin felszabadulás miatt végzetes aritmiát okozhat ¹⁸, egyéb szövetekben további gyulladásos folyamatokat, az erekben trombotikus folyamatokat segíthet elő.

Az ATP (és ADP) azonban nemcsak a P2 receptorok agonistája, hanem ektonukleotidázok szubsztrátja is. Ezek az enzimek modulálják a receptorokon kiváltott hatást a nukleotidok gyors hidrolízisével. Az ektonukleotidázok és a P2 receptorok közötti kapcsolat azonban még nem bizonyított. Ektonukleotidáz és purinoreceptor együttes előfordulását eddig mindössze egy esetben, emberi méhlepény endotélsejtjeinek kaveoláiban sikerült csak kimutatni ¹⁹. A kaveolákban a kaveolin1 és kaveolin3 fehérjék, azok, melyek a jellegzetes membránformáció kialakításáért felelősek, kötik meg az ektonukleotidázok közé tartozó NTPDáz1 (*ektonukleozid trifoszfát*

difoszfohidroláz) enzimet ²⁰, és még számos jelátvitelben érdekelt fehérjét, köztük receptorokat is.

Úgy tűnik, a nukleotidok közvetítette jelátvitelt ektonukleotidázok szabályozzák, és ez a különféle nukleotidázok eltérő eloszlása miatt nemcsak időbeli, de - és ebben a kaveolák igen fontos szerepet játszhatnak - térbeli szabályozás is ^{21,22}.

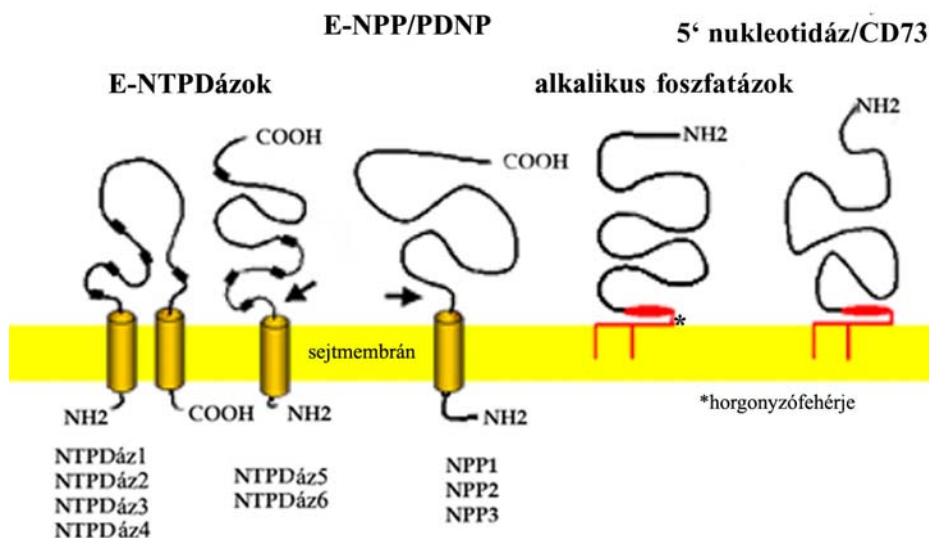
EKTONUKLEOTIDÁZOK

Az ektonukleotidáz enzimek a sejtek közötti térbe kerülő nukleotidokat bontják. A folyamat hidrolízis, és eredményeként foszfát szabadul fel. Hasonló reakció játszódik le a sejtek különböző organelumaiban található, vagy a sejtmembránba beépült P, V, F osztályokba sorolt endonukleázok esetében is, azonban a különböző csoportokba tartozó enzimeknek nemcsak funkciója, szerkezete is különböző (1. táblázat).

OSZTÁLY	KÉPVISELŐ	SZUBSZTRÁT	GÁTLÓSZER	JELLEGZETESSÉG	ION-TRANSPORT
P	Na ⁺ /K ⁺ -ATPáz	ATP	ouabain	kovalensen kötött foszforilált közti termék	igen
	Ca ⁺⁺ -ATPáz	ATP	vanadát		igen
V	H ⁺ -ATPáz	ATP	N-etil maleimid	H ⁺	igen
F	F0/F1-ATPáz	ATP	oligomocin	ATP-szintézis	igen
E	NTPDáz2 NTPDáz1	NTP NTP/NDP	nincs nincs	ektoenzim	nem jellemző

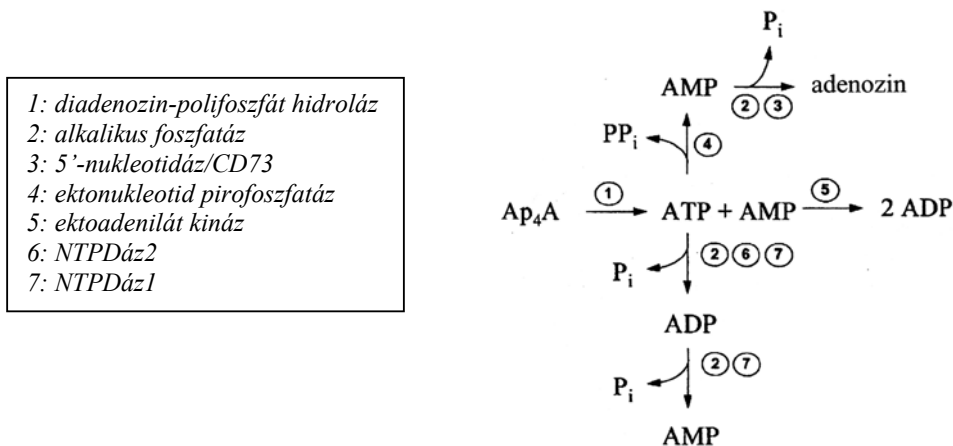
1. táblázat ATP-t bontó enzimek osztályozása

Az ektonukleotidázok közé tartoznak az alkalikus foszfatázok, az NTPDázok (*ektonukleozid trifoszfát difoszfahidrolázok*), az ektonukleotid pirofoszfatázok/nukleotid-foszfodiészterázok (NPP/PDNP) és az 5'-nukleotidáz/CD73. Az enzimek közös jellemzője, hogy általában széles szubsztrátspecifitással rendelkeznek, nemcsak adenin nukleotidokat bontanak. Mindegyik enzim glikozilált és vagy membránba beépülő fehérje vagy horgonyzófehérjén (pl. GPI: glikozil foszfatidil inozitol) keresztül kapcsolódik a sejtmembránhoz (*ld. 1. ábra, alkalikus foszfatázok ill. 5'-nukleotidáz*). Az enzimek aktív centruma a sejtmembrán külső felszínén helyezkedik el. Az, hogy a hidrolízisben milyen enzimek vesznek részt, a szövet, ill. a sejt fajtájától függ, és ebben igen nagyok az eltérések. Az ektonukleotidázoknak köszönhető az is, hogy a sejtek újra hasznosíthatják az értékes purinokat. Ugyanis míg a sejtek nukleotidok felvételére általában nem képesek, a defoszforilált nukleozid termékek már a megfelelő transzportrendszerekkel felvehetők és ismét felhasználhatók.



1. ábra Az ektonukleotidázok szerkezete és elhelyezkedésük a membránban²³

Az ektonukleotidok hidrolizációs láncfolyamatát az NTPDázok és pirofoszfatazok/nukleotid-foszfodiészterázok indítják el és az 5'-nukleotidáz/CD73 (EC 3.1.3.5.) fejezi be, adenin nukleotidok esetében az adenosin monofoszfát adenosinná alakításával (2. ábra).



2. ábra Az adenin nukleotidok és a bontásukat végző enzimek

Az ektonukleotidázok feladata azonban több, mint a nukleotidok receptor közvetítette hatásának szüntetése, hiszen ligandokat képeznek más receptorok számára; az adenzin előállításával beindítják az adenzin közvetítette folyamatokat és nélkülözhetetlen szerepük van a metabolikus folyamatok homeosztázisában is.

Az **alkalikus foszfatázok** rendelkeznek a legszélesebb szubsztrátspecifitással, nem specifikus monoészter aktivitásuk is van. Működésüket a szabad foszfát gátolja, specifikus gátlószerük a levamisol vagy a cisztein ²⁴. A szervezetben betöltött szerepük fontosságát mutatja, hogy szövetspecifikus és nem szövetspecifikus formáik gyakorlatilag minden szövetben megtalálhatók, s az alkalikus foszfatázokat emberben legalább négy gén kódolja ²⁵. Szerepük alapvető a májban, vázizomzatban, vesében és a csontképződésben is ²⁶.

Az **ektonukleotid pirofoszfatázok/nukleotid-foszfodiészterázok** csoportjába tartozó enzimek nukleotidok és nukleinsavak foszfodiészterázkötéseit is képesek hidrolizálni, így pl. a 3'5'-cAMP-t vagy ATP-t AMP-vé és pirofoszfáttá alakítják. Több tagjuk szolubilis formában is megtalálható, transzmembrán és az aktív centrumot tartalmazó extracelluláris alegységük igen jól megőrzött, míg a citoplazmában lévő szövettől-fajtól függően nagy változatosságot mutat. Klónozásukat is elvégezték ²⁷.

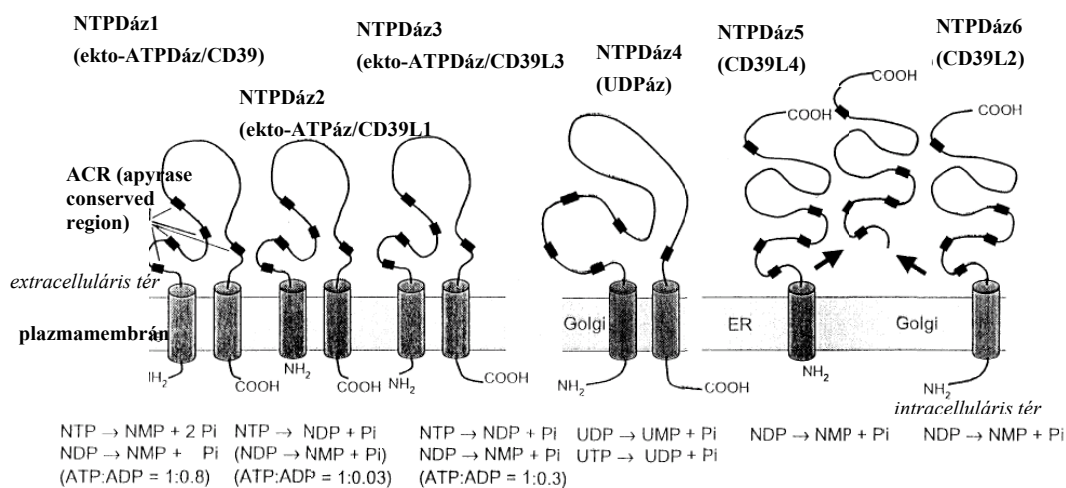
Az **5'-nukleotidáz/CD73 (EC 3.1.3.5.)** adenin nukleotidok esetében az adenzin monofoszfátból adenzint képez. Az enzim cink aktiválta metalloenzim, mely dimer formában aktív és az uracil és guanin monofoszfátok is a szubsztrátjai, míg az ATP és ADP kompetitív gátlószerei. Specifikus gátlószere az 5'- α,β -metilén ADP. Szerkezete jól megőrzött, emlősekben gyakorlatilag ugyanaz a molekula fordul elő. Enzimatis hasítás eredményeként az őt a sejtmembránhoz kötő GPI-láncról megszabadulva szolubilis formában is megtalálható a sejtek közötti térben. 1993-ban állapították meg, hogy a CD73 sejtmarkerrel azonos B és T limfocitákban ²⁸. Feltételezik, hogy sejtkapcsoló funkciója is van, ischémia alatt aktivitása megnő ^{8,29}.

Az NTPDázokhoz tartozó enzimek a régebbi leírásokban - *saját munkáinkban is* - mint ekto-ATPázok, apirázok, CD39 vagy E-típusú ATPázok szerepeltek ³⁰. A nevezéktani zűrzavart egy 1998-as megállapodás – legalább is hivatalosan – megszüntette ³¹. Az NTPDázok aktivitását Ca^{++} ill. Mg^{++} jelenléte befolyásolja, nukleozid 5'-tri és difoszfátokat hidrolizálnak. Az NTPDázok (EC. 3.6.1. – ektonukleozidtrifoszfát difoszfahidrolázok) egyik tagját, az apirázt (új elnevezése NTPDáz1), a burgonyában már 1962-ben megtalálták és jellemezték ^{32,33}, később az enzimet több állati és emberi szövetben is azonosították. Több rokon enzim eloszlását is ismerjük, vannak adataink biokémiai sajátosságairól is, klónozásuk is megtörtént ³⁴⁻³⁶, mégis azt kell mondanunk, pontos élettani szerepük máig nem tisztázott ^{23,37-40}. Tanulmányozásukat több tényező is megnehezíti. Igaz, hogy aktivitásuk magas, aktuális koncentrációjuk a sejtmembránban azonban igen csekély. Többszörösen glikozilált molekulák, ami bonyolultabbá teszi a tisztítási eljárásokat, és a pontos molekulásúly ill. aminosavsorrend meghatározását is ^{41,42}. Mivel az enzimek a sejtmembránba beépülve találhatók, tisztításuk során szükség van a lipidkörnyezet eltávolítására. Az alkalmazott detergensek azonban nemcsak “megnyílni” segítik a membránt, de a legtöbb esetben az enzim aktivitása is a tisztítás áldozatául esik ⁴³. Az enzimkinetikai paraméterek megadása sem egyszerű. Mivel ezek az enzimek mind ATPáz, mind ADPáz aktivitással rendelkeznek, kimutatható köztitermék pedig nincs, a K_m és v_{max} értékeket egzakt módon nem tudjuk meghatározni. Immunhisztokémiai vizsgálatokat a kereskedelembe kapható antitestekkel csak az utóbbi évtizedben lehetett végezni, és csak emberi szöveten. A leggyakrabban használt patkány ill. egér szövetre alkalmas házilag előállított antitestek néhány labor birtokában voltak – ami viszont igen kiterjedt és főképp az antitestet előállítók számára felettébb hasznos kollaborációt segített elő. Specifikus gátlószer azonban még mindig nincs ellenük. Ígéretesnek tűnt az FPL 67156 (ARL 67156 néven is ismert, 6-N,N-dietil- β,γ -dibromometilén-D-ATP) alkalmazása ^{44,45}, de enzimhisztokémiai vizsgálatokra még a javasoltnál nagyobb koncentrációban sem volt eléggé hatékony ⁴⁶. Újabban a P2 receptorok antagonistáit próbálják alkalmazni erre a célra, azzal a nem titkolt reménnyel, hogy a gátlószereknek alkalmas antagonisták a gyógyászatban is felhasználhatóak lesznek ⁴⁷.

Minden nehézség és a sokszor nehezen összevethető adatok ellenére azonban vitán felül áll, hogy ezen enzimek egyik fontos funkciója a P2 receptorok által közvetített jelátviteli folyamatok modulálása a sejtek közötti térben levő ATP és ADP eltávolításával. Itt nemcsak az ATP/ADP hidrolíziséről van szó, hiszen az 5'-nukleotidáz/CD73 hatására végtermékként keletkező adenzin a saját receptorait fogja aktiválni, aminek eredményeként épp ellenkező hatás léphet fel.

Az NTPDáz/CD39 enzimcsalád tagjai

Az NTPDáz enzimes család tagjainak fehérjeszerkezete nagyfokú hasonlóságot mutat ⁴⁸ (3. ábra). A fehérje N- és C-terminálisai a legtöbb NTPDáz izoenzim esetében a sejtek citoplazmájában, a molekula legnagyobb része viszont, amely általában az öt apiráz-megőrzött régiót (ACR) és az enzim aktív centrumát is tartalmazza, a sejtek közötti térben helyezkedik el. Az NTPDáz5 és 6 szolubilis formában is előfordul. Nem olyan régen azonosították az NTPDáz8-at COS sejtekben ⁴⁹.



3. ábra Az NTPDázok szerkezete és jellemző reakcióik ⁵⁰

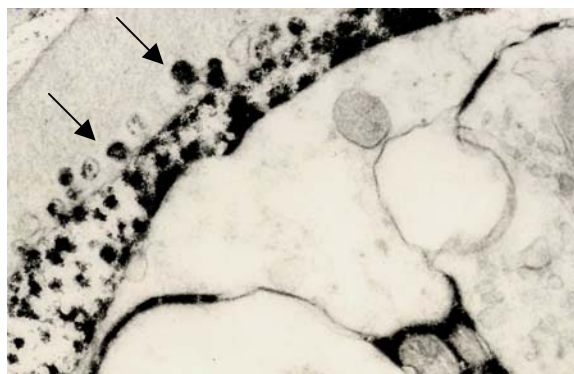
A központi és környéki idegrendszerben két ilyen ektonukleotidázt írtak eddig le, az NTPDáz1-et (*ektonukleozid trifoszfát difoszfohidroláz1*) és az NTPDáz2-t⁵¹⁻⁵³. A két transzmembrán enzim szerkezetileg igen hasonló, de az NTPDáz1 ATP-t és ADP-t kb.

azonos sebességgel hidrolizál, míg az NTPDáz2 fő szubsztrátja az ATP. Zimmermann és munkacsoportja eredményei arra utalnak, az NTPDáz1 csak mikroglia és endotélsejteken, valamint az erek simaizom sejtjeiben található, míg az ideg- és gliasejtek enzimje az NTPDáz2, melynek fontos szerepe a glia és idegsejtek közötti párbeszéd fenntartása, biztosítása. Közvetve azonban az NTPDáz1-nek is lehet szerepe az idegsejtek és asztrociták P2 receptorok közvetítette kapcsolataiban, hiszen a mikroglia mindkét sejtípussal szoros kapcsolatban vannak ⁵¹. Mások vizsgálatai is igazolták az NTPDáz1 és NTPDáz2 jelenlétét különböző agyterületeken, de az előbb leírtakkal ellentétben, mindkét enzimet megtalálták szinaptikus membránokon ⁵⁴.

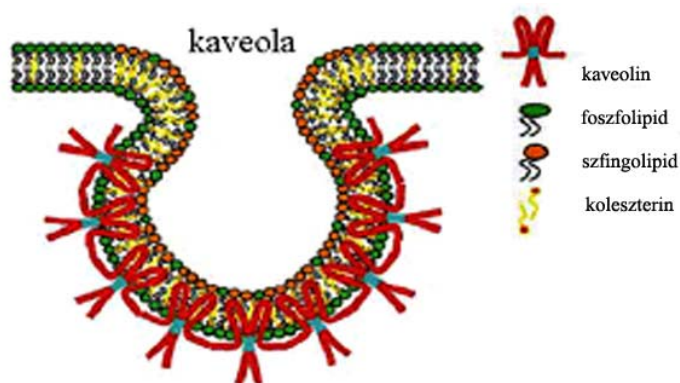
Számos adat áll már rendelkezésünkre arról, hogyan szabályozzák az NTPDázok a sejtek által különböző stimulusok hatására kibocsátott nukleotidok koncentrációját, s egyre újabb eredmények olvashatók arról is, hogy a különböző szervekben melyik NTPDáz játszhatja az elsődleges szerepet ^{49,55-60}. Azt azonban, hogy az NTPDázok milyen pontos élettani szerepet töltenek be a purinerg jelátviteli folyamatok szabályozásában, még nem ismerjük ^{58,61-67}. A legújabb, sejttenyészeteken végzett kísérletek arra utalnak ⁶⁷, hogy a P2Y1 receptor alapaktivitásának fenntartásában igen lényeges szerepet játszik, milyen NTPDáz van a receptor közvetlen szomszédságában. Arra is van adatunk, hogy igen közel lehet az ATP-kibocsátás helyéhez maga az NTPDáz enzim ⁶⁸. Mára elfogadottá lett, hogy a purinerg szabályozás mind a központi, mind a környéki idegrendszer számára nélkülözhetetlen. Az NTPDázok közül az NTPDáz1 alkalmazása a trombózisok megelőzésében, szövetkilökődések megakadályozására egészen közelinek tűnik már ⁴⁷, de azt, hogy az NTPDázok és purinoceptorok miként hatnak egymásra, még nem ismerjük.

KAVEOLÁK-KAVEOLINOK

Palade és Yamada az ötvenes években fedezte fel az endotél- és epitélisejtekben a formájuk után (*cave=barlang*) kaveoláknak nevezett membránképződményeket ^{69,70}. Jóval később ismertük meg összetételüket és szerkezetüket ⁷¹⁻⁷³. Magas koleszterintartalmú, szfingolipidekben is gazdag, Triton X100-ban 4°C-on gyakorlatilag nem oldódó, kis sűrűségük alapján könnyen elkülöníthető membránszakaszok, melyeket kaveolin fehérjék formálnak flaskaformájú befűződésekké (4. ábra), és koncentráltan tartalmaznak a „hagyományos” membránrészekben nem, vagy csak jóval alacsonyabb koncentrációban található, jelátvitelben szerepet játszó molekulákat (5. ábra).



4. ábra Ekto-ATPáz enzimaktivitást mutató (cériumfoszfát csapadékkal telt) kaveolák tengerimalac Auerbach plexusának simaizomsejtjében (felv.:Kittel)



5. ábra A kaveolák alakja és felépítése

(www.home.student.uva.nl/.../samenvatting.htm)

A kaveolák vázfehérjéje a kaveolin. A jellegzetes szerkezet kialakulásához az egyes ill. kettős módosulat nélkülözhetetlen, a kaveolin-2 önmagában nem elegendő, és jelenléte a kaveolin-1 mellett nem is szükségszerű. A molekula N-terminálisa a belső membránhoz kapcsolódik, a C-terminális két cisztein származékához kötődő zsírsav (általában palmitinsav) által rögzül a plazmamembránhoz. Az izoformák között az N-terminális hosszában van különbség (a kaveolin-1-ben a leghosszabb), valamint a kaveolin-2 fehérjéből hiányzik az itt található állványzati egységnek (*scaffolding domain*) nevezett kb. 20 aminosavból álló, aromás aminosavakban gazdag fehérjéket kötő rész ⁷⁴. Ez a molekularészlet igen fontos, mivel ide kapcsolódnak azok a molekulák, melyek révén a kaveola részt vesz az endocitotikus (*toxinok, baktériumok és vírusok sejtbe való bejutása*) transz- és intercelluláris folyamatokban, a jelátvitelben, fehérjék osztályozásban (*protein sorting*), a koleszterinszint szabályozásában (*koleszterin efflux*), lipidtranszportban, sőt, még olyan ún. klatrin-independes transzportfolyamatokban is, mint a kalciummegyensúly fenntartásához nélkülözhetetlen Ca^{2+} -efflux ^{75,76}.

A kaveolinok közül a legtöbb sejt kaveolájában előforduló kaveolin-1-et ismerjük legjobban. Ez a fehérje valószínűleg lassítja, vagy gátolja az endocitózist a hozzá kapcsolódott fehérjék foszforilálásának segítségével ^{75,77}. Biokémiai vizsgálatok sora mutatta ki a kaveolin állványzati részéhez közvetlenül kapcsolódó Gs fehérje alegységek, H-Ras fehérjék, hormonok, Src és JAK kinázok, különféle receptorok (*pl. eNOS, EGF, GH, ösztrogén- és inzulinreceptor*), MAP kinázok és egyes protein kináz C izoformák jelenlétét ⁷⁸⁻⁸⁵. Számos receptor és kináz alapállapotban dúsul fel a kaveolákban, és csak aktiválás után helyeződik át a membrán más szakaszára ill. kerül be a sejtbe ⁷⁸. Néhány esetben a kaveolin és a kaveolában feldúsuló receptor expressziója közötti összefüggésekre is fény derült ^{82,86-89}. Általában azt mondhatjuk, hogy a kaveolin a jelmolekulák inhibitora ⁹⁰⁻⁹⁵, bár vannak olyan fehérjék is, amelyek működését a kaveolák stimulálják, mint pl. az inzulin-receptor vagy a β 2-adrenerg receptor ⁹⁶⁻⁹⁸. A kaveolin fehérjék hiánya vagy mutációja súlyos betegségekhez vezethet, épp ezért fontos szerep vár rájuk, főképp a kardiovaszkuláris és az izombetegségek diagnosztikájában ⁹⁹⁻¹⁰⁴.

A kardiovaszkuláris rendszer sejtei, az endotél- és simaizomsejtek, makrofágok, szívizomsejtek és fibroblasztok különösen gazdagok kaveolában. Simaizomsejtek ilyen membránbefűződéseiről mutattuk ki, hogy nagy ekto-ATPáz aktivitással rendelkeznek és kifejezik az NTPDáz1 enzimet. Más preparátum, emberi méhlepény endotélsejtjeinek kaveoláiról pedig leírtuk, hogy nemcsak az NTPDáz1 enzim, de a P2Y1 purinoceptor is megtalálható bennük³⁶⁻⁴³. Valószínűsíthető azonban, hogy más purinoceptorok is kötődnek ide, mint pl. a szerkezetében az NTPDázokra leginkább emlékeztető P2X7 purinoceptor.

PURINOCEPTOROK

A ligandumként purin nukleotidokat megkötő purinerg receptorok osztályozására is Burnstock tett először javaslatot¹⁰⁵. A P1 csoportba tartozó receptorok adenzinra, míg a P2-höz tartozók ATP-re ill. ADP-re szelektívek (bár receptortól függően, más ligandumokkal is aktiválhatók). A P2Y receptorok G-proteinhez kapcsolódnak, míg a P2X receptorokhoz tartozók ligandum-függő ioncsatornák. Egyre több purinoceptort ismerünk, ezek élettani szerepéről, gyógyászati jelentőségéről számos közlemény jelent és jelenik meg¹⁰⁶⁻¹¹³. A P2X7 receptorról ismert, hogy jelentős mennyiségben szintetizálódik patológias folyamatok során¹¹⁴. A purinoceptorok és NTPDázok egymás közvetlen közelségében való előfordulása az ugyanazon szubsztrát ill. ligandum iránti versengésük miatt logikusnak látszik, de, a már említett NTPDáz1-P2Y1 receptor kaveolában való előfordulása kivételével, ma még nem bizonyított. Az a tény, hogy a purinoceptorok nem egyformán érzékenyek az ATP-re vagy ADP-re, és az ugyanezen molekulákra szintén eltérő érzékenységet mutató NTPDázok szövetenként és az adott szöveten belül is differenciált eloszlást mutatnak, indokoltá teszi azt a feltételezést, hogy a purinerg jelátvitel időbeli és térbeli szabályozása a receptorok és az NTPDázok együttes munkájának eredménye. A vaszkulaturában mindenesetre ezt a térbeli szabályozást épp az NTPDáz1 (*ekto-ATPDáz*) és NTPDáz 2 (elsősorban *ekto-ATPáz*) eltérő eloszlása miatt már felvetették^{21,22}.

CÉLKITŰZÉS

Munkánk során számos szervben-szövetben-sejtvonalon kerestük a kapcsolatot az NTPDázok, P2 receptorok, és a mindkettőt kötni tudó kaveolinok között, hogy többet tudhassunk meg nemcsak ezekről a fehérjékről, de élettani-kórélettani szerepükről, magáról a purinerg szabályozásról is.

Vizsgálatainkban a következő kérdésekre kerestünk választ:

- különböző fajok azonos típusú/eredetű szöveteiben/sejtjeiben azonos-e az NTPDázok eloszlása? Beszélhetünk-e fajspecifitásról?
- van-e kiemelt szerepük az idegrendszerben?
- hogyan kerül az enzim a kaveolákba, mi lehet ott a szerepe?
- létrejöhet-e az NTPDáz molekulák és purinoceptorok között kapcsolat?
- a sejtek egymással való érintkezése befolyásolja-e az enzimaktivitást? Van-e sejtkapcsoló szerepe az NTPDázoknak?
- patológiás folyamatok (sugárzások, gyulladások, ischémiás folyamatok) hatnak-e az enzim/ek eloszlására, aktivitására?
- lehet-e szerepe a az NTPDázoknak a tumoros transzformációk kialakulásában?

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A kísérletekben használt faj, szövetféleség vagy sejt kultúra alkalmazását előző saját, ill. az irodalomból megismert munkák indokolták (2. táblázat).

FAJ	SZERV/SZÖVET
egér	agykéreg mediális habenula hasnyálmirigy szubmandibuláris nyálmirigy
patkány	agykéreg felső nyaki szimpatikus ganglion aorta hasnyálmirigy (és hasnyál)
tengerimalac	hasnyálmirigy (és hasnyál)
sertés	vese
ember	hasnyálmirigy (műtétből származó, I. Sebészet, SOTE) hasnyál (műtétből ill. Utána, I. Sebészet, SOTE) méhlepény (9-10 hetes, természetes abortuszból, SOTE, I. Női Klinika) méhlepény (érett, szülés után, Harvard, Boston) szívizom (<i>bypass műtétből származó, Ér-és Szívsebészeti Klinika, SOTE</i>) szívizom (<i>átültetésre kerülő szívből, Ér-és Szívsebészeti Klinika, SOTE</i>) szívizom (<i>szívbillentyű-műtét során eltávolított, Gottsegen György Nemzeti Szívsebészeti Intézet, Budapest</i>)

2. táblázat A kísérletek során felhasznált szerv- ill. szövetféleségek.

Mind az állati, mind az emberi szöveteken végzett kísérletek elvégzéséhez a szükséges etikai engedéllyel rendelkezünk.

sejtenyészet	eredet
COS-7	majom vese epitelsejt
PC12	patkány pheochromocytomasejt
kapilláris endotél	patkány, agy szürkeállomány
asztrocita	patkány, előagy újszülött állatból
HUVEC	ember, köldökvéna
adenohipofízis	ember

3. táblázat A kísérletek során alkalmazott sejtenyészetfajták

A COS-7 és HUVEC tenyészeteken végzett munka egy részét külföldi laboratóriumokkal való együttműködésben végeztük, egyébként a tenyészetet is saját laboratóriumunkban állítottuk elő. Főként külföldi laboratóriumokban (Harvard, Boston, Laval Univ, Quebec) dolgoztam a CD39 génkiütött egerek szövetein és belga laboratóriumokban (Rega Institute, Leuven, LUC, Diepenbeek) sajátíthattam el a molekuláris biológiai módszereket.

SEJTENYÉSZETEK KÉSZÍTÉSE

COS-7 sejtenyészet

A COS-sejteket 10 % főtális borjúsérummal kiegészített DMEM* tápfolyadékban tenyésztettük, ami 2 mM L-glutamint 100 egység/ml penicillin G-t és 100 µg/ml streptomycint is tartalmazott. Az inkubátorban a hőmérséklet 37°C volt, a nedves levegő 5% CO₂-ot tartalmazott.

* DMEM: Dulbecco modified Eagle 's medium

Asztrocita sejtenyészet

Az asztrocitákat újszülött patkányok előagyából, Madarász és mtsai által leírt módszer szerint nyertük és tisztítottuk ¹¹⁵ (Kalmár B. és Környei Zs. munkája). A sejteket 4 mM glutamin, 40 µg/ml gentamycin és az első két napon 0.5 µg/ml amphotericint is tartalmazó MEM* tápfolyadékban tartottuk 15-22 napon át 37°C-os inkubátorban, ahol a nedves levegő 5% CO₂-ot tartalmazott. A tápfolyadékot háromnaponként cseréltük. A felhasznált sejtek 95-98 %-ban asztrociták voltak, mint azt a kísérletekkor rutinszerűen elvégzett GFAP** -festés igazolta.

HUVEC*** sejtenyészet

A frissen eltávolított emberi köldökvéna endotélsejteket dr. Simon Robson laboratóriumában (Harvard, BIDMC), az E. Kaczmarek által alkalmazott módszer szerint tenyésztettük ⁹. A sejtek 20 % főtális borjúsérummal dúsított, 50µg/ml endoteliális növekedési faktort és 100 µg/ml heparint is tartalmazó M199 tápfolyadékban, 37 °C-on, nedves, 5% széndioxid tartalmú atmoszférában növekedtek. Három passzálás után az elektronmikroszkópos munkára való előkészítésként, a sejteket nyolccllyukú tenyésztőedénybe tettük át. Fixálásuk a sejtek letapadását követő napon történt.

Emberi adenohipofízis tenyészet

A *post mortem* eltávolított adenohipofízisekből készített tenyészeteket prof. Gyévai Angéla és munkatársai által kidolgozott eljárás alapján készítettük ¹¹⁶. A steril körülmények között eltávolított adenohipofízis azonnal 4°C-os M199 tápoldatba került, ebben szállították át a laboratóriumba. Az adenohipofízisről a kötő-és zsírszövetet eltávolítottuk, a szöveti blokkot feldaraboltuk, többszöri, elsőként 4°C-on, éjszakán át

* MEM: modified Eagle 's medium

** GFAP: glial fibrillary acidic protein

*** HUVEC: human umbilical vein endothelial cell culture

tartó tripszines emésztés után az összegyűjtött sejteket nyolccljúkú tenyésztőedénybe ültettük ki 20 % főtális borjuszérumot, 20 % 1.2 %-os D-glükózt, 1.5 % 0.1M HEPES* puffert tartalmazó M199 tápfolyadékkal. A tápfolyadékot kétnaponta cseréltük. Az inkubátorban a hőmérséklet 37°C volt, a nedves levegő 5 % CO₂-ot tartalmazott. A sejteket a kiültetés utáni 7-8. napon fixáltuk.

Az egyes esetekben alkalmazott eljárások részletes ismertetése az idézett cikkekben található.

SZÖVETI MINTÁK KIVÉTELE, FIXÁLÁS

Általában a hasi aortán keresztül (5-10 °C-os fixáló oldat**, 30 perc) perfúziós fixálást alkalmaztunk, az állat CO₂-dal történő elkábítása majd az állat fajtájának és súlyának megfelelő mennyiségű Nembutál vagy klorálhidrátos altató alkalmazása után.

Immerziós fixálásra került sor, ha a perfúziós fixálást a szövet fajtája ill. más célra is történő felhasználása miatt alkalmazni nem lehetett (*pl. műtétből származó emberi hasnyálmirigyszövet, emberi szívizomszövet, sertés vese, sejtenyészetek*).

A fixálandó szövetet a lehetőség szerint kis blokkokra vágtuk (2-3 mm³ - 1cm³ között), a fixáló oldatot félóránként cseréltük. Fixálási idő a blokk méretétől függően 1-3 óra volt. Amennyiben az enzim ill. immunreakciókat fagyasztott metszeten végeztük, a blokk fagyasztása előtt szacharózos krioprotekciót alkalmaztunk.

Sejtenyészeteket 30 percig fixáltunk szobahőmérsékleten.

* HEPES: N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid

** általánosan használt fixáló oldat: 3-4 % paraformaldehid, 0.5-1 % glutáraldehid, 2 mM CaCl₂ foszfát vagy kakodilát pufferben, pH 7.5

AZ EKTO-ATPÁZ/ATPDÁZ AKTIVITÁS HISZTOKÉMIAI KIMUTATÁSA

Saját fejlesztésű ólmos ill. cériumos fémkicsapásos módszert alkalmaztunk, amit az irodalomban található régebbi eljárások alapján dolgoztunk ki ¹¹⁷.

A fixált, 50 μm -nél nem vastagabb szövetszeletet ill. sejt kultúrát egy ATP/ADP-t, mint enzimszubsztrátot, az enzimaktiváshoz szükséges kétértékű kationt (5 mM Mn^{2+} -t), az ismert ATP-t hidrolizáló enzimek elleni gátlószereket (1 mM levamisol a nem specifikus foszfatázok, 1 mM ouabain a Na^+, K^+ -ATPáz, 50 μM α, β -metilén-ADP az 5'-nukleotidáz ellen) és fénymikroszkópos vizsgálat esetén 2 mM ólomnitrátot, elektronmikroszkópos célra 3 mM cériumkloridot tartalmazó Tris-maleát pufferben, 37 °C-on, (pH 7.4), a vizsgált minta vastagságától függő ideig (15-45 perc) inkubáltuk. Az ATP-ből ill. ADP-ből az aktív enzim hatására foszfátsoport szabadul fel, ami az ólom- vagy cérium ionnal a reakció helyén oldhatatlan, mikroszkóp alatt jól látható csapadékot képez.

Fénymikroszkópos célokra - *a szintén általunk módosított*- ólomsós eljárást használtuk. Az inkubáló oldat 2 mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ -t tartalmazott cériumsó helyett. A képződött világos színű ólomfoszfát csapadékot ammóniumsulfid oldattal, mikroszkóp alatt figyelve a reakció előrehaladását, sötétbarna ólomsulfiddá alakítottuk (ld. asztrociták: ¹¹⁸). A képződött csapadék kristályszemcséi a cériumfoszfáténál nagyobbak, de a reakció gondos kivitelezése mellett háttérfestődés itt sem jelenik meg.

Enzimhisztokémiai reakció „in situ” az ekto-ATPDáz aktivitás kimutatására

Az állat Nembutálos altatása és az erek fiziológiás sóoldattal rövid ideig (<5 perc) történő kimosása után az általában alkalmazott 30 perces fixálás helyett 15 perces, csak paraformaldehidet tartalmazó fixáló oldattal perfundáltunk, majd ezt követően a fixálót 5 perces pufferes mosással eltávolítottuk. Az ekto-ATPáz aktivitás kimutatására használt inkubálóoldatot kis sebességgel, 20 percen keresztül áramoltattuk. Pufferes mosás után a kívánt szövetet kimetszettük és utófixáltuk, majd a fixáló kimosása és a szöveti blokk metszése után a szokásos beágyazási eljárásnak vetettük alá.

Az így kapott reakció mutatta leghívebben az aortákat borító endotélsejtek enzimaktivitását és őrizte meg az aorták szerkezeti épségét is.

AZ EKTO-ATPÁZ AKTIVITÁS MEGHATÁROZÁSÁNAK MÓDSZEREI

A klasszikus mérés szöveti homogenátumban történt. Ez vagy teljes szöveti homogenizátumot vagy membránfrakciót jelentett. A homogenizáláshoz oldatként szolgáló TBS* puffer PMSF** -et és aprotinint*** tartalmazott, hogy a fehérjéket a degradálódástól megvédjük. A homogenizálást szonikátor többszöri, de igen rövid ideig tartó (1-1 sec) alkalmazása segítette elő, a preparátumot mindvégig 4°C-on tartottuk. A homogenizátumokból készült membránfrakciókat különböző ideig tartó és sebességgel történő centrifugálások után kaptuk. A fehérjetartalmat Bradford eljárása szerint határoztuk meg¹¹⁹. Az enzimaktivitásokat kolorimetriás módszerrel a frakciók előállításának napján mértük meg LeBel¹²⁰ vagy Baykov eljárása szerint¹²¹.

LeBel eljárás szerinti ATPDáz aktivitásmérés

Sejtkultúrák, fagyasztott metszetek esetében alkalmaztuk.

A reakcióelegy különböző ATPázok elleni gátlószereket (1 mM ouabain a Na^+, K^+ -ATPáz, 0.1 mg/ml concnalinA a CD73/5'-nukleotidáz, 1 mM N-etiléndiamin a plazmamembrán H^+ -ATPáz, 5 $\mu\text{g/ml}$ oligomycin a mitokondriális ATPáz, 1 mM Na-vanadát a Ca^{++} -ATPáz ellen), 100 mM NaCl-t, 5 mM KCl-ot és 2 mM ATP-t tartalmazott 30 mM-os Tris-HCL pufferben (pH 7.5). A reakciót 30 perc után egy CuSO_4 -et, SDS****-t, Na-acetátot, heptamolibdátot, Ecol-4-metilaminoszulfátot és Na_2SO_3 -ot tartalmazó oldattal (pH 4.0) állítottuk le. Tizenöt perc elteltével spektrofotométerrel 600 nm hullámhossznál mértük a keletkezett szerves foszfátot.

* TBS: tris buffered saline

** PMSF: phenyl-metil-sulphonyl chloride, a proteínázK inaktívátora

*** aprotinin: általános proteáz inhibitor

**** SDS: sodium-dodecyl sulphate

Baykov eljárása szerinti ATPDáz aktivitásmérés

A mérést 37°C-on, CaCl₂-t, imidazolt és az alkalikus foszfatázok gátlószereként alkalmazott teramisolt tartalmazó Tris-HCl pufferben (pH7.5) végeztük, szubsztrátként ATP-t vagy ADP-t használtunk, a reakciót az erősen savas közegben malachitzöld-hidrokloridot és ammónium-molibdenátot tartalmazó malachitzöld reagenssel állítottuk le. A szövethomogenizátumhoz adott ATP ill. ADP az jelenlevő aktív ektoenzim hatására hidrolízál, a felszabaduló foszfátból foszfomolibdenát képződik, ami a malachitfestékkel színes végterméket ad. A spektrofotometráls eredményéből számítható az enzimaktivitás (mU=nM szervesen foszfát/mgfehérje/perc).

Az ATPáz-aktivitás mérését nemcsak biokémiai szöveti homogenátumban vagy élő sejteken, de azonos mennyiségű, így összehasonlítható fixált fagyasztott metszeteken, ill. fixált sejteken *(96 lyukú tenyésztőedényt használtunk erre a célra)* is elvégeztük. (Ilyen méréseket mások előttünk nem végeztek.) Ebben az esetben kontrollként az azonos mennyiségű fixálatlan sejten ill. fagyasztott metszeten kapott érték szolgált. A fixálatlan sejtek, metszetek esetében az aktivitásra kapott érték természetesen magasabb volt, mint a fixálás után mért, de ez az alacsonyabb aktivitási érték is bizonyította, hogy a fixálás nem inaktiválta az ektoenzimet és a reakció végtermékeként keletkező csapadék valóban az aktív ekto-ATPáz enzimből származik

118

Biolumineszcensz mérés az ATPáz aktivitás és az enzim aktivitási állandóinak meghatározására

Hasnyálminták esetében alkalmaztuk.

A hasnyálhoz ATP-t adtunk és az ATP- koncentráció változását mértük az oldatban ¹²². A kinetikai állandó kiszámításához három különböző kiindulási ATP koncentrációt használtunk (10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} M). A Michaelis állandót a Lineweaver-Burk görbe alapján számítottuk. A hasnyálban található ektoATPáz aktivitás kiszámításához összehasonlító méréseket végeztünk egy ismert ekto-ATPáz, az apiráz különböző koncentrációinak jelenlétében. Az apiráz esetében kapott v_{\max} értékeket lineáris regresszió módszerrel

analizáltuk, a hasnyálban lévő enzimaktivitást az apirázzal kapott görbék alapján számoltuk ki.

Az enzim ATPáz aktivitásának és a bomlástermékek koncentrációjának meghatározása nagynyomású folyadékkromatográfiás módszerrel (HPLC)

Műtétből származó emberi szívizom ATPáz aktivitásának mérésére használtuk. Az oxigénnel dúsított Krebs-oldatban lévő, meghatározott mennyiségű (10-15 mg) szívizommintákhoz ATP-t adtunk és az ATP-koncentráció változását mértük az oldatban ¹²². A HPLC technika segítségével nemcsak a kinetikai állandók mérése volt lehetséges, de a bomlástermékek koncentrációváltozásának követése is.

KALCIUM ELEKTRONMIKROSKÓPOS KIMUTATÁSA

A Ca elektronmikroszkópos kimutatásának egyik bevált, régi módszere, hogy a szövetben található kalciumból oldhatatlan, elektrondenz csapadékot, Ca-piroantimonátot, majd második lépésben Ca-oxalátot alakítanak ki. Az általunk bevezetett módosított eljárás során a Ca-piroantimonát mikrokristályai már a lassú perfundálás során, in situ kialakulnak. A kristályok méretét az immerziós oldatban történő fixálás tovább növeli, és nincs szükség az oxaláttá való átalakításra ¹²³. Módszerünk a szokásos piroantimonátos-oxalátos technikával kapott csapadéknál finomabb szemcséket eredményez, gyakorlatilag háttér nélkül. A kapott eloszlás megegyezik a bonyolultabb, drágább, idő-és technikaigényesebb mérések eredményeivel ¹²⁴. Módszerünk előnye még, hogy agyszövetre is alkalmazható, amelynél az általánosan alkalmazott ESI* - technikával végzett kalciummérés igen nehezen kivitelezhető.

* ESI: electron spectroscopic imaging

IMMUNHISZTOKÉMIA

Az NTPDáz1 és NTPDáz2 kimutatása

Az NTPDáz1 és NTPDáz2 kimutatására egér ill. patkányszöveten az ellenük termelt „házi” antitesteket *(készítette Raf Lemmens, Belgium, Diepenbeek, ill. A. Beaudoin laboratóriuma, Quebec, Kanada, Jean Sevigny-Simon Robson együttműködésében Harvard, Boston)* emberi szöveten ill. emberi eredetű sejtvonalon a különböző cégektől vásárolt, de ugyanabból a törzsből (BU61) származó antitestet teszteltem és használtam. A klasszikus ABC (avidin-biotin komplex) módszert, kromogénként a barna színreakciót adó diamino-benzidint (DAB) ill. a Vector Laboratories által előállított VIP *(bordó)* és SG *(kék)* festékeket, vagy a piros színt eredményező alkalikus foszfatáz-FAST RED reakciókat alkalmaztam a gyártó előirata szerint.

Immunreakció sejttypusok azonosítására fény-és elektronmikroszkópos szinten

Humán hasnyálmirigy fagyasztott metszetein a különböző sejttypusok immunfestéssel történő azonosításakor Fast Red kromogént használtam. Humán hipofízistenyészet sejtjeinek elektronmikroszkópos szinten történő azonosítására a - több esetben kettős – immunreakciót ultravékony metszeteken végeztem és aranyjelölést használtam.

Enzim-és immunfestés együttes alkalmazásakor, akár fény-, akár elektronmikroszkópos szinten történt a vizsgálat, az enzimhisztokémiai reakció mindig megelőzte az immunreakciókat.

Immunreakció ultrakriosztátos metszeteken

Az ultrakriosztátos metszetek vastagsága fénymikroszkópos célokra végzett festések esetében 300 nm volt, elektronmikroszkóp használatakor 70-100 nm. A metszetek készítésekor és a festések esetében is a Tokuyasu módszer¹²⁵ módosított változatát alkalmaztam.

Western blot analízis

A sejteket vagy szöveteket 4°C-on, proteinázgátlókat tartalmazó lízispufferben homogenizáltuk ill. membránpreparátumot készítettünk. A felvitt 10-20 µg mennyiségű fehérjék elválasztása 7.5-10 %-os Na-dodecilsulfát-poliakrilamid gélen, elektroforézissel* történt Laemmli előírata szerint ¹²⁶. Az elválasztott fehérjéket az ún. nedves elektroblottolással PVDF** membránra vittük át, majd a nem specifikus kötőhelyek blokkolása után a kívánt antitesttel inkubáltuk. A fehérjesávok láthatóvá tétele torma-peroxidázzal kapcsolt második antitesttel végzett inkubálás után ECL*** reagenssel történt a gyártó előírása alapján. A membránt ezután Kodak filmre exponáltuk.

KAVEOLA PREPARÁTUM KÉSZÍTÉSE

A különféle tenyésztett sejtekből előállított kaveolákat és Triton X-100-ban nem oldódó sejtmembrán részecskéket tartalmazó preparátumot a prof. M. Liscovitch laboratóriumában (Weizmann Intézet, Rehovot) beállított módszer szerint készítettük.

A tenyésztőedényben lévő kb. 5×10^8 sejtet jéghideg PBS-sel kétszer mostuk, majd a PBS alapos leszívása után az aljatról felszedtük. Jégen, 1 ml lízis pufferben homogenizáltuk és 1 ml 80 %-os cukoroldatot adtunk hozzá. Az így nyert, 40 % cukrot tartalmazó lizátumot cukorgradiensre rétegeztük. A cukorgradiens 4-4 ml 30 és 5 %-os cukoroldatból állt. 39000 rpm-mel 16-20 órát centrifugáltuk, majd 900 µl-es frakciókat gyűjtöttünk. Ezeket a frakciókat használtuk fel a Western blot analízisre ¹²⁷.

COS -7 SEJTEK TRANSZFEKTÁLÁSA

A lipofektaminos módszert alkalmaztuk. A DMEM**** tenyésztőfolyadékban növesztett sejtekhez 2 µg plazmid DNS-t adtunk, amit előzőleg 45 percig 6 µl lipofektamin

* SDS-PAGE: sodium-dodecylsulfate-poliacrylamide-gel electrophoresis

** PVDF: polyvinylidene difluoride

*** ECL: Renaissance Enhanced Chemiluminescence (NEN, Life Science Products)

**** DMEM : Dulbecco's modified Eagle medium

reagenssel előinkubáltunk. Az inkubálás 37°C-on, 5 órán keresztül tartott. A transzfektálást főtális borjúsérum hozzáadásával állítottuk le. 24 óra múlva a tápfolyadékot lecseréltük. 72 óra elteltével elvégeztük a méréseket, vagy a sejteket feltripszinezttük és újra kiültettük. Az újabb kiültetéskor a tápfolyadékhoz 400 µg/ml geneticint (G418) is adtunk. Az ilyen körülmények közt tenyésztett sejtek heteken át expresszálták a kívánt fehérjét és voltak alkalmasak további kísérletekre.

ARANYKOLLOID KÉSZÍTÉSE ÉS FELVÉTELE ASZTROCITASEJTEKKEL

Az aranyhidrokloridból (HAuCl₄) nátriumcitrátos módszerrel készített aranykolloid oldat kb. 15 nm átmérőjű aranyszemcséket tartalmazott. A többszörösen centrifugált és kétszer desztillált vízben mosott aranyszemcséket a harmadik centrifugálás (15 000 rpm, 10 perc) után desztillált vízben újrasszuszpendáltuk és felhasználás előtt 0.2 µm-es szűrőn sterilre szűrtük. A 600 µl tenyésztőfolyadékban tartott sejtekhez a 24 órás LPS kezelés 20. órájában adtuk a 60 µl aranykolloid oldatot. Kétféle kontrollt is használtunk. Egyik esetben a négyórás inkubálás LPS előkezelés nélkül történt, a másik kontroll esetében az aranykolloid oldatot LPS-kezelt sejtekhez adtuk, de a következő négy órában a sejteket 4°C-on tartottuk.

MIKROHULLÁMÚ, ILL. GSM RF* EGÉSZTEST BESUGÁRZÁS

A kalciumeloszlás ill. a kalciumfüggő ATPázok élettani dózisú besugárzásokra való érzékenysége vizsgálatához egereket sugároztunk be ellenőrzött körülmények között az OSSKI-ban, az ott kidolgozott eljárás szerint történt ¹²³. A különböző idejű besugárzások után az egereket Nembutállal elaltattam, majd a Ca-piroantimonátos ill. az enzimhisztokémiai eljárásnak megfelelő módon perfundáltam.

* GSM RF: global system for mobile telecommunications radio frequency

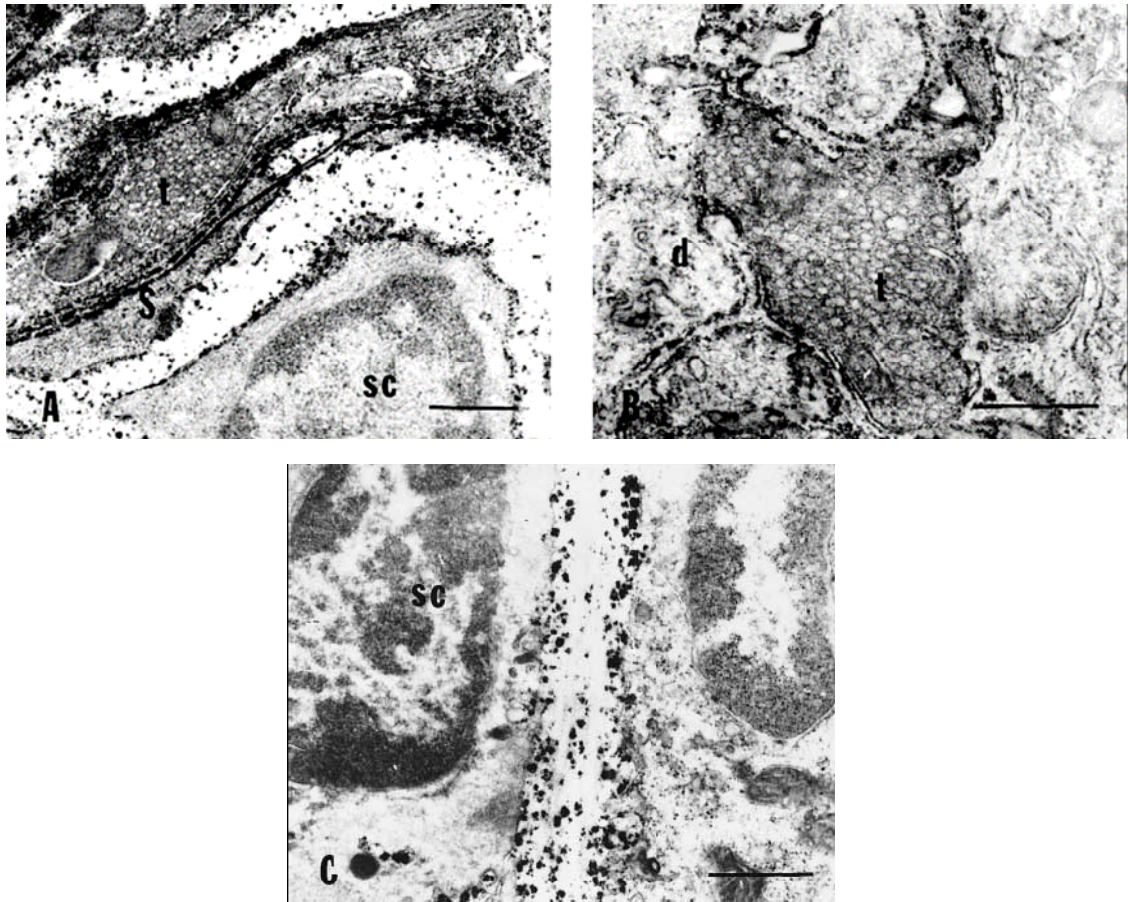
Az általunk módosított/fejlesztett eljárások:

- az aktív ekto-ATPáz/ATPDáz enzim kimutatása ólomsós módszerrel fénymikroszkópos célra ^{117,118}
- az aktív ekto-ATPáz/ATPDáz enzim kimutatására elektronmikroszkópos szinten is alkalmas, az irodalomban addig leírt módszereknél kisebb háttérrel és megbízhatóbban dolgozó cériumlecsapásos enzimhisztokémiai technika ¹¹⁷
- enzimhisztokémia in situ endotélsejtek ekto-ATPáz aktivitásának kimutatására ⁴⁶
- az agyban lévő kalcium elektronmikroszkópos szinten történő kimutatására alkalmas eljárás ¹²³

AZ EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK

EKTO-ATPÁZOKTÓL AZ NTPDÁZOKIG

Az a felismerés, hogy az ATP nemcsak energiahordozó, de neuromodulátor és gyors neurotranszmitter is a környéki¹²⁸ és a központi idegrendszerben^{129,130}, azonnal felvetette annak szükségességét, hogy azonosítsák azokat az enzimeket, melyek a neurotranszmitter ATP bontását végzik, és feltehetőleg a szinapszisok közelében találhatók. Az extracelluláris ATP-hidrolízisét HPLC technikával végzett mérések már bizonyították^{122,131}. Első ilyen jellegű munkánkban a mediális habenulában, azon agyterületen írtuk le az ekto-ATPáz előfordulását, ahol a központi idegrendszeren belül először mutattak ki ATP-indukálta szinaptikus áramokat¹²⁹. Az alkalmazott enzimhisztokémiai reakció eredményeként kapott egyenlőtlen csapadékeloszlás azonnal felhívta a figyelmet arra, hogy az idegsejteknek nem egyforma mértékben lehet szüksége ATP-t hidrolizáló enzimre. Több esetben szomszédos idegsejtek membránján is látványosan különbözött az aktív enzimet jelző csapadékmennyiség^{122,132}. A habenulán kapott egyenlőtlen eloszlást azzal magyaráztuk, hogy a szinapszisokban is jelenlevő ekto-ATPáz enzimre elsősorban a purinerg idegsejteknek van szüksége, ahol az ATP ingerlés hatására más neurotranszmitterekkel együtt kikerül a vezikulákból. Így az enzim hozzájárul a P2 reaktivációjához. Ezt az elgondolást alátámasztotta az Auerbach plexus vizsgálatának eredménye is, ahol az enzim szintén jelen volt a kolinerg idegvégződések membránján¹³¹. Amikor azonban az ekto-ATPáz eloszlási mintázatát patkány felső nyaki szimpatikus ganglionban tanulmányoztuk, az eddigiektől eltérő eredményt kaptunk¹³³. Találtunk ugyan az idegvégződések membránján az enzimreakció eredményeképpen keletkezett, aktív enzim jelenlétére utaló cériumcsapadékot, de ez a csapadékmennyiség összevethető volt azzal, amennyit az idegvégződés környékén lévő Schwann-sejtek és szatellitasejtek membránja, valamint a sejtek közti tér tartalmazott (6. ábra).

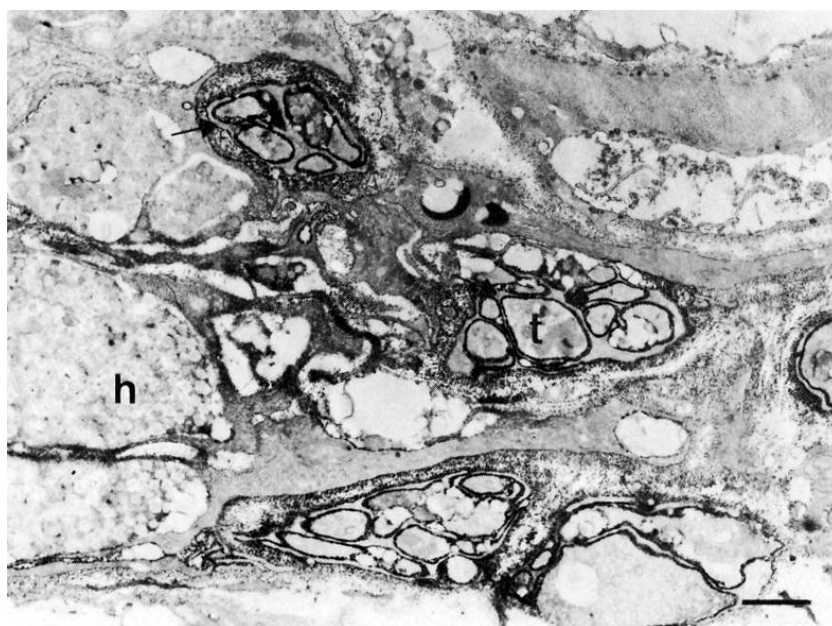


6. ábra Patkány felső nyaki szimpatikus ganglionjában a cériumfoszfát csapadékkal jelzett aktív ekto-ATPáz enzim eloszlása. A: Az idegvégződés (t), a Schwann-sejt nyúlványokkal (S) borított idegsejtnyúlványok membránja egyaránt csapadékkal fedett. A szomszédos szatellitasejt (sc) membránján ugyancsak ekto-ATPáz jelenlétére utaló csapadék látható. B: Egy idegvégződés (t) és néhány dendritnyúlvány (d) membránja az aktív enzim jelenlétét mutatja. C: A szatellitasejtek (sc) membránján aktív enzim található, de enzimaktivásra utaló csapadék látható az egyik sejt citoplazmájában is ¹³³.

skála: 200 nm

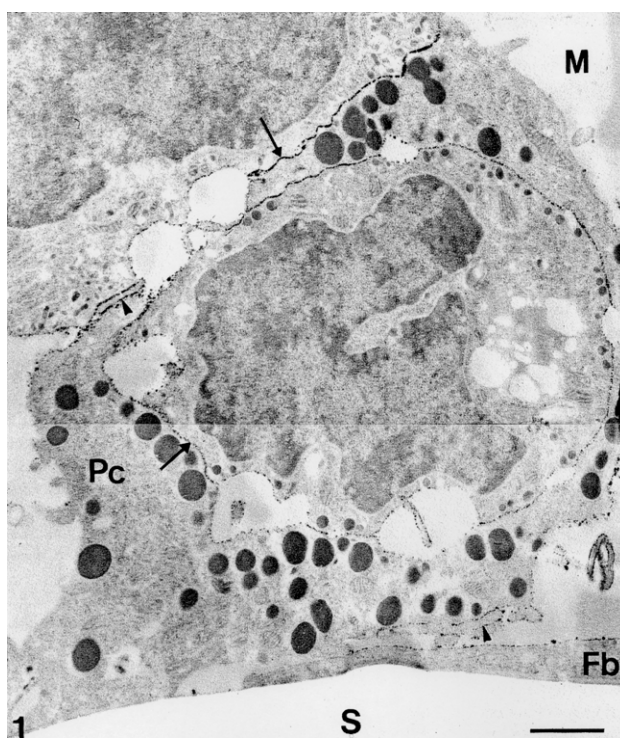
A képekkel dokumentált ekto-ATPáz eloszlás szerint az extracelluláris ATP bontásában nemcsak az idegsejteken, Schwann-sejteken és szatellitasejteken, de a sejtek közötti térben előforduló oldékony ekto-ATPáz módosulat is részt vesz. Ebből a jelenségből arra következtettünk, hogy itt a feleslegben levő ATP gyors bontása, amit HPLC-s méréssel is bizonyítottunk, nem elsősorban az idegsejtek, de az őket körülvevő gliasejtek feladata lehet. Magukban a terminálisokban az enzim alacsonyabb expressziója vagy kisebb aktivitása miatt, elhúzódhat az ingerlés hatása a habenula purinerg idegein vagy az Auerbach-plexusban levővel összevetve.

Egy másik, idegelemeket tartalmazó szöveten, patkány neurohipofízisében az ekto-ATPáz aktivitását a mások által nem alkalmazott perfúziós módszerrel vizsgáltuk. Elméletileg ezzel a módszerrel a valósághoz legközelebbi eloszlást kaphatjuk (7. ábra).



7. ábra Patkány neurohipofízisének ekto-ATPáz eloszlása. Nagy mennyiségben jelenlevő aktív enzimre utal az idegvégződések membránján (t), és az extracelluláris térben (nyíl) jelenlevő csapadék. Az idegvégződések körülölelő lamina externa és és kollagénrostok membránja szintén enzimaktivitást mutat, de a nagy, világos vezikulákkal teli hormontermelő sejtek (h) nyúlványainak membránján alig található csapadék ⁴⁶. skála: 1µm

Tankönyvi adat már, hogy a neurohipofízis idegvégződéseinek neuroszekréciós granulumai oxitocin és vazopresszin mellett ATP-t is tartalmaznak, és P2X és P2Y receptorokat is kimutattak az idegsejtek membránján^{134,135}. Ezekkel az eredményekkel összhangban van az ekto-ATPáz jelenlétére utaló bőséges csapadék a sejtek membránján és idegsejtterminálisok és a kollagénrostok közötti szolubilis forma jelenléte is. Könnyen belátható, hogy az ekto-ATPáz az ATP hidrolízisével a purinoceptorok reaktivációját segítheti, sőt, a receptorokra gyakorolt hatáson kívül áttételesen a hormonkiválasztásra is hat, mivel a P2 receptorok szabályozó funkciót töltenek be az idegsejtek kiválasztó tevékenységében^{134,135}. Az ekto-ATPázoknak azonban nincs feltétlen kapcsolata a hormonkiválasztás szabályozásával, mint azt emberi adenohipofízisszöveten végzett kísérleteink bizonyítják (8. ábra)¹³⁶.



8. ábra Emberi adenohipofízis tenyészet, a tenyésztési síkra merőleges metszet. A nagy, szabad sejtfelszíneken nincs enzimaktivásra utaló csapadék¹³⁶

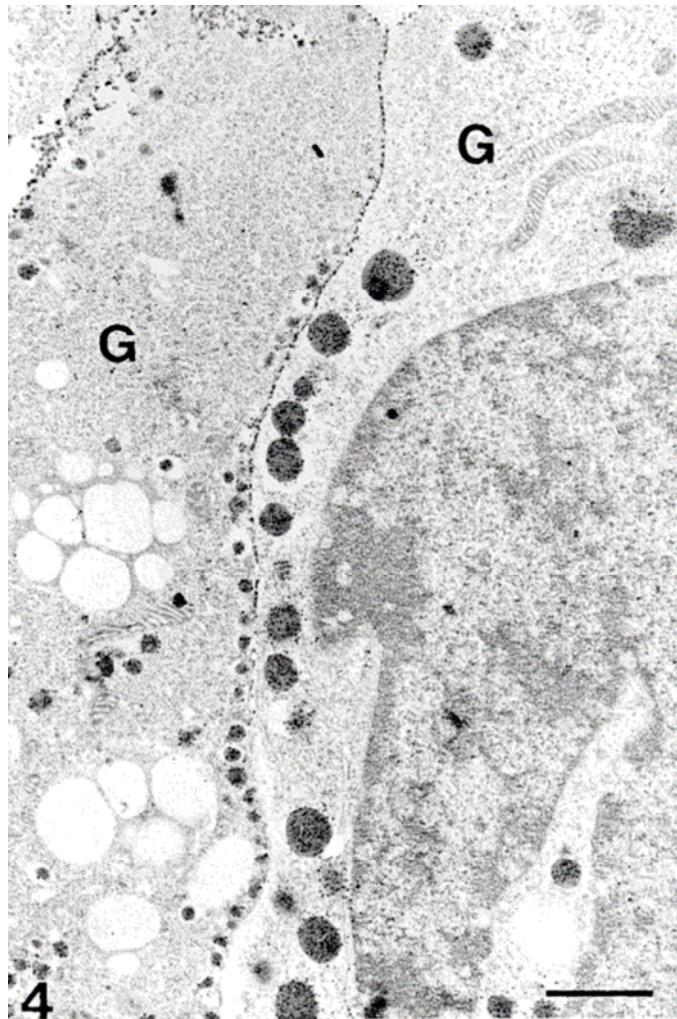
(Nyíllal jelölve az ekto-ATPáz reakció. Pc: parenchyma sejt, Fb: fibroblaszt, nyílhegy: follikulus stimuláló hormont termelő sejt nyúlványa, M: tápfolyadék felőli oldal, S: műanyag aljzat, skála: 1 μ m)

Az enzimhisztokémiai reakció eredménye az enzim többek által feltételezett, de egyértelműen nem bizonyított sejtkapcsoló funkcióját ¹³⁷⁻¹⁴² látszott megerősíteni ¹³⁶, hiszen míg az egymással szorosan érintkező sejtek esetében általában találtunk csapadékot, a sejtek nagyobb távolsága esetén, vagy az aljzaton fekvő sejtek enyésztoedény felőli oldalán nem. Feltételezhető tehát, hogy az emésztés hatására sejtekre szétesett szövetből képződő tenyészetben a szerveződés kialakulása során fontos szerepe van az itt kifejeződő ekto-ATPáz enzimnek. Az adenohipofízis különböző hormonokat (*növekedési-tireoidea stimuláló, adrenokortikotróp, follikulus stimuláló, luteinizáló hormon, prolaktin és gamma melanocita stimuláló hormon*) termelő sejtjei közül immunarany módszerrel a növekedési és a prolaktin hormonokat termelő sejteket tudtuk azonosítani, a follikulus stimuláló sejtek azonosítása morfológiai szempontok szerint történt. A soknyúlványú, sejtek közé ékelődő follikulus stimuláló sejtek membránja mindig fedve volt csapadékkal, de más hormontermelő sejtek esetében, ha azonos sejtek voltak egymás mellett, a csapadék mennyisége jól láthatóan kevesebb volt, vagy nem is jelent meg (*9. ábra*).



9. ábra **Emberi adenohipfízisből készült tenyészet. A két, immunaranyfestéssel azonosított növekedési hormont termelő sejt (G) szomszédos membránja jelöletlen, míg a mindkettővel szomszédos, azonosítatlan sejt oldalán levő membránjuk ekto-ATPáz aktivitásra utaló csapadékkal fedett** ¹³⁶ skála: 1µm

A növekedési hormont termelő sejteknél két, morfológiailag jól megkülönböztethető altípust találtunk. Nemcsak a sejtek alakja - oszlopalakú ill. sokszög alakú sejtek – de hormontároló vezikuláiknak alakja-mérete is más volt. Ha ilyen sejtek kerültek a tenyészetben egymás mellé, bár azonos hormont termeltek, szomszédos membránjukon mindig jelen volt az aktív enzimre utaló csapadék (10. ábra).

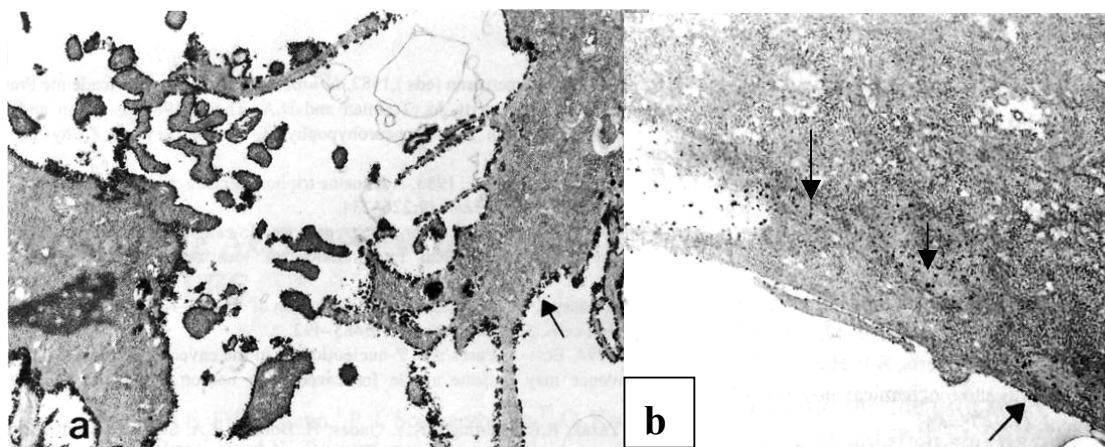


10. ábra Emberi adenohipfízisből készült tenyészet. Két különböző morfológiájú immunaranyfestéssel azonosított növekedési hormont termelő sejt (G). Szomszédos membránjuk ekto-ATPáz aktivitást jelző csapadékkal fedett ¹³⁶ skála: 1 μ m

Eredményeink arra utalnak, hogy ebben a szövetben az ekto-ATPáz enzim aktivitása nem az egyedi sejtek elsődleges sajátja, hanem két vagy több sejt egymásra hatásának következménye. Ezt a feltételezést alátámasztja, hogy hipofízis szöveti blokkon, azaz nem tenyészetben, hasonló eloszlási mintázatot kaptunk. A hipofízisszövetben található ekto-ATPáz enzim sejtkapcsoló funkciója elősegítheti a szervre jellemző szerveződés kialakulását.

Az enzimnek vagy aktív formájának megjelenése tehát a szomszédos sejt ill. az onnan kapott valamilyen „jel” függvénye lehet. Amennyiben ilyen szignál nem érkezik, aktív enzim nem fejeződik ki, ezért nincs csapadék a sejtek tenyésztőedény felőli oldalán, ahogy ezt patkány asztrocita tenyészetben is tapasztaltuk ¹¹⁷.

És erre utalhatnak PC 12 sejteken végzett kísérleteink eredményei is. Egy ekto-ATPáz elleni gátlószer, az FPL67156 ^{44,45,143} kipróbálásakor észleltük, hogy a gátlószer hatására a szabad sejtfelszíneken erőteljesen lecsökkent vagy el is tűnt az enzimhisztokémiai reakciót jelző csapadék mennyisége, de ahol a sejtek szorosan érintkeztek, továbbra is jelentős enzimaktivitásra utaló csapadékot találtunk ⁴⁶. Feltételezhető, hogy a sejtek egymáshoz való közelsége segítette az ekto-ATPáz aktivitásának megőrződését az enzim gátlószerének jelenlétében is (11. ábra).

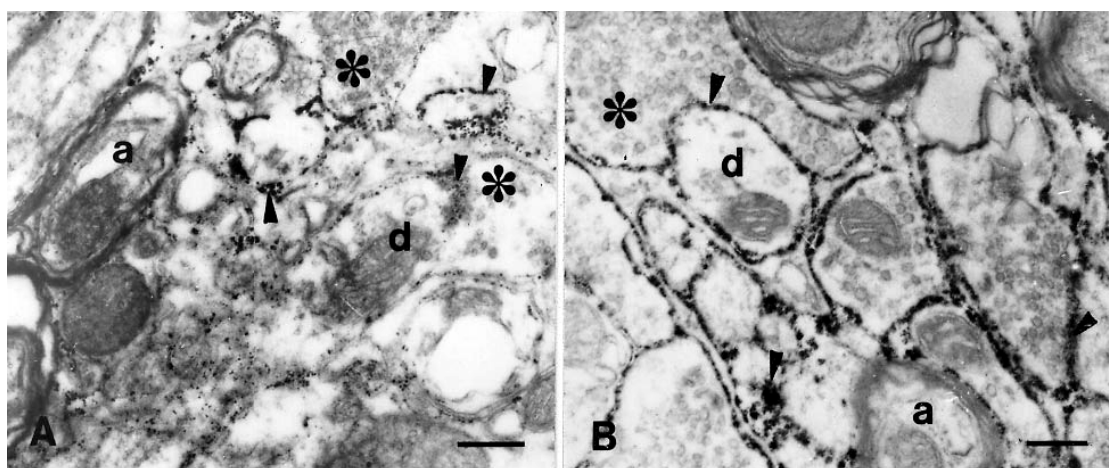


11. ábra PC12 sejttenyészet. a: Cériumfoszfát csapadék jelzi az ekto-ATPáz aktivitást a sejtek felszínén. b: Enzimaktivitás FPL67156 alkalmazása mellett ⁴⁶

A sejtre, szövetre azonban nemcsak a szomszédos sejtek hatnak, hanem külső tényezők is, mint pl. a mindnyájunkat nemcsak körülvevő, de át is járó sugárzások. Érdeemesnek tűnt megvizsgálni, nem okozhatnak-e változást ennek az igen elterjedt, sok formában megtalálható enzimnek az aktivitásában vagy kifejeződésében olyan, ma már szinte mindenki által használt sugárforrások, mint a mikrosütők vagy rádiótelefonok.

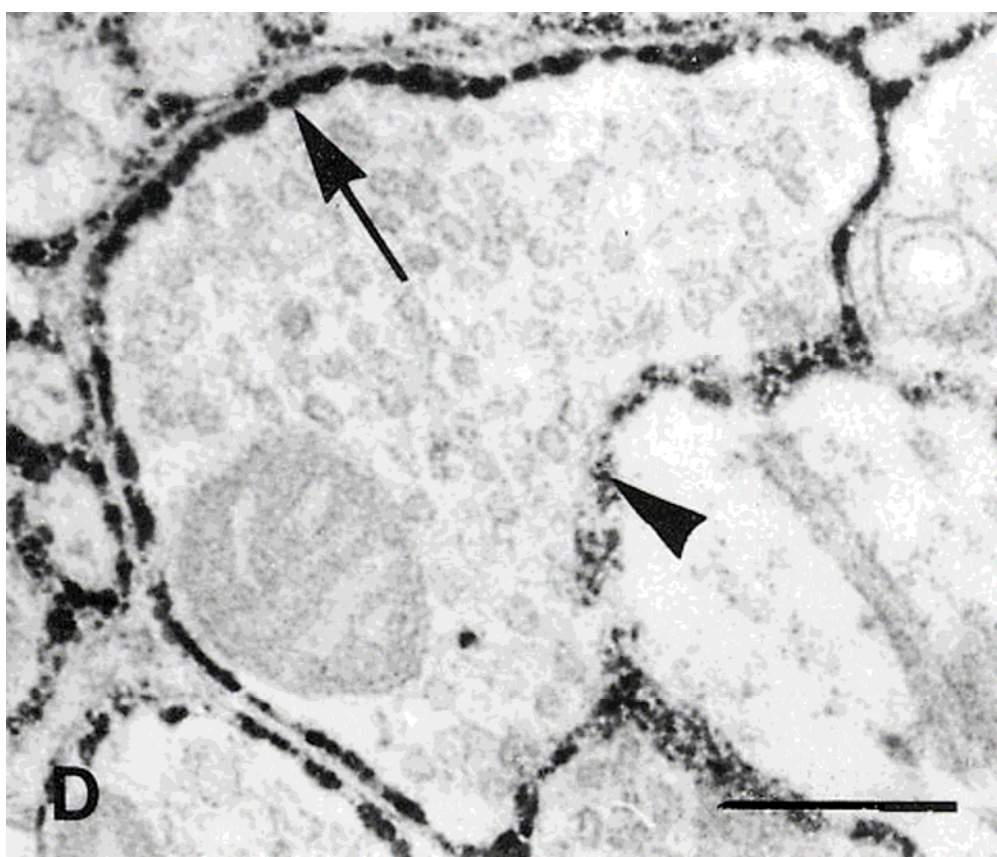
Egereket sugároztunk be kontrollált körülmények között, elhanyagolható mértékű hőhatással rendelkező mikrohullámmal ill. GSM rádióhullámmal. Olyan frekvencia- és energia tartományt alkalmaztunk, ami jelen ismereteink szerint az egészségre nem káros. Megvizsgáltuk az ekto-ATPáz enzim eloszlását és a Ca-eloszlást is, az általunk módosított piroantimonátos módszert alkalmazva. A kalciumeloszlás vizsgálata azért tűnt fontosnak, mert az ekto-ATPázok működéséhez szükség van kalciumra vagy magnéziumra, és az ezek megoszlásában előforduló változások szintén befolyásolhatják az enzimaktivitást.

A vizsgálatokat mediális habenulán végeztük, ahol már ismertük az ekto-ATPáz eloszlását^{122,132}. A mikrohullámú besugárzás ugyan nem változtatta meg az ekto-ATPáz eloszlási mintázatát, de az aktív enzimre utaló csapadék mennyisége megnőtt (12. ábra).



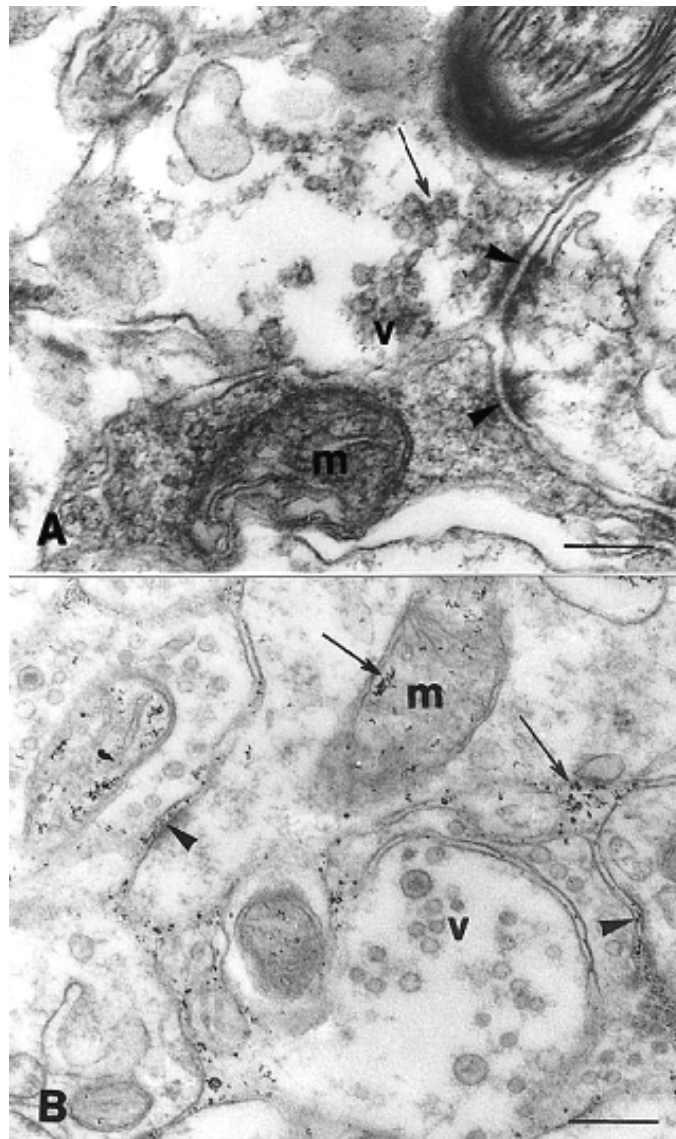
12. ábra Egér mediális habenulaszövet. Ekto-ATPáz aktivitást jelző csapadék a kontroll állatban (A) és 1 óra mikrohullámmal történt besugárzás után (B)¹²³. (a: axon, d: dendrit, *: terminális, nyílhegy: aktív enzimet jelző csapadék; skála: 0.5 μ m)

A metszeteket összehasonlítva látható, hogy bár a csapadék eloszlása a két esetben hasonló - *legtöbb a dendritek és idegvégződések membránján lelhető fel, a myelinnel burkolt axonok membránján nem található* - mennyisége az 1 órás besugárzást követően megnőtt. Huszonnégy órával a besugárzás után további változásra figyeltünk fel. A fokozott ekto-ATPáz aktivitás mellett endo-ATPáz, elhelyezkedése és quercetinre, egy Ca-pumpa blokkolóra való érzékenysége alapján Ca-pumpa ATPáz aktivitást is ki tudtunk mutatni némely idegi terminálison (13. ábra).



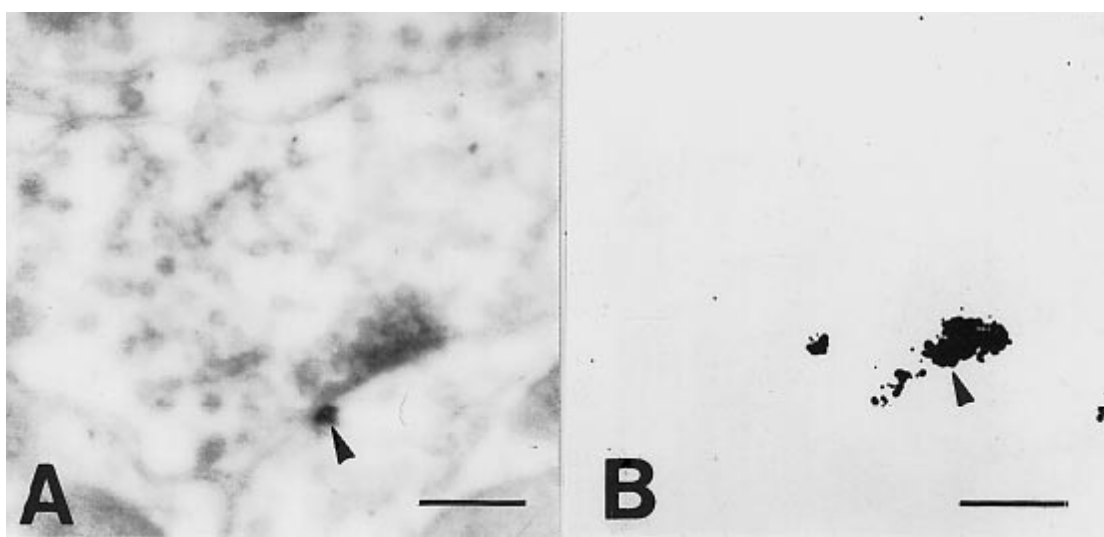
13. ábra Ekto-és endo-ATPáz aktivitás egér mediális habenulaszöveten 24 órával kisenergiájú mikrohullámmal történt besugárzás után. *nyíl*: Ca-pumpa –aktivitást jelző csapadék idegvégződés membránján, ekto-ATPáz aktivitást jelző (nyílhegy) a dendrittel szomszédos oldalon. Szinapszis nem azonosítható ¹²³. skála: 0.5 μ m

Ez a változás mindenképp a besugárzás hatásának tulajdonítható, ui. számos kísérletünk során soha nem talákoztunk ilyen jelenséggel; az aktivitást jelző csapadék mindig a sejtek közötti tér felé helyezkedett el. Megfigyeltük, hogy a Ca-pumpa ATPáz aktivitása fixálás hatására nem egyszerűen csökken, mint az az ekto-ATPázok esetében történik, de azt fixálótól függően teljesen el is veszítheti. Igen valószínű, hogy ennek a pumpa-ATPáz aktivitásnak a jelenléte összefüggésben van a kalciumeloszlásban történt változással (14. ábra).



14. ábra Egér mediális habenula. A: Ca-piroantimonát szemcsék az idegvégződések vezikuláiban (v, nyíl). A szinapszisokban nincs csapadék. (kontroll állat) B: Mikrohullámmal történt besugárzás után a szinapszisban (nyílhegy) és a sejtek közötti térben (nyíl) is Ca-piroantimonát szemcsék találhatók. A mitokondriumokban (m) található Ca-piroantimonát szemcsék száma nem mutatott jelentős különbséget ¹²³. skála: 0.25 μ m

A kalciumot ESI* technikával azonosítottuk (15. ábra).

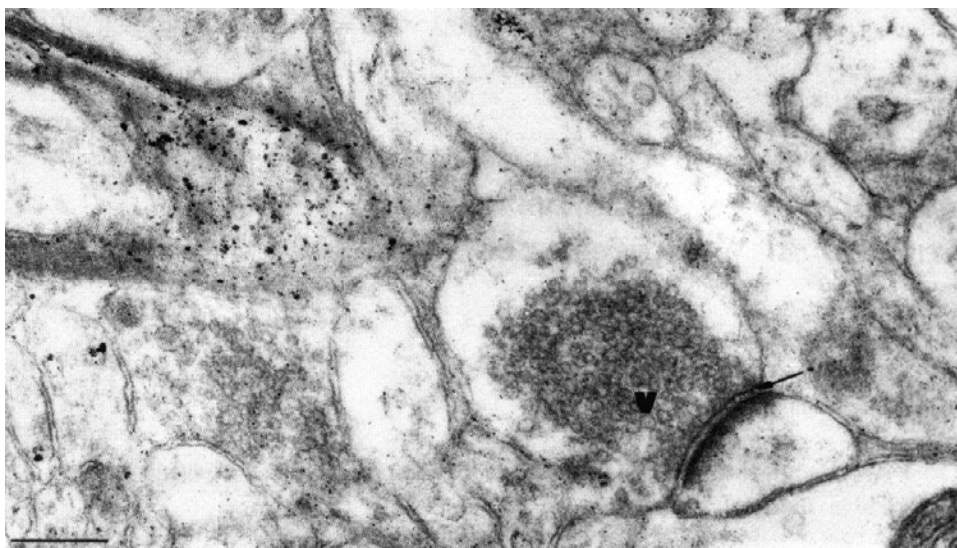


15. ábra A transzmissziós elektronmikroszkópos képen látható szinapszis elhelyezkedése (A) megfelel az ESI technikával készített, Ca-jelet mutató képnek ¹²³ skála: 0.5 μ m

A sugárzás fokozta a vezikulákból az ingerületátvivő anyagok kiáramlását, köztük az ATP kikerülését, és kalciumkiáramlást is előidézett. Ez magyarázatot adhat arra, miért kellett megnövekedjen az ekto-ATPáz mennyisége és/vagy az enzim aktivitása. Feltételezzük, hogy a kalciumpumpa „túlélését” is a megváltozott kalciumeloszlás okozta.

* ESI: electron spectroscopic imaging

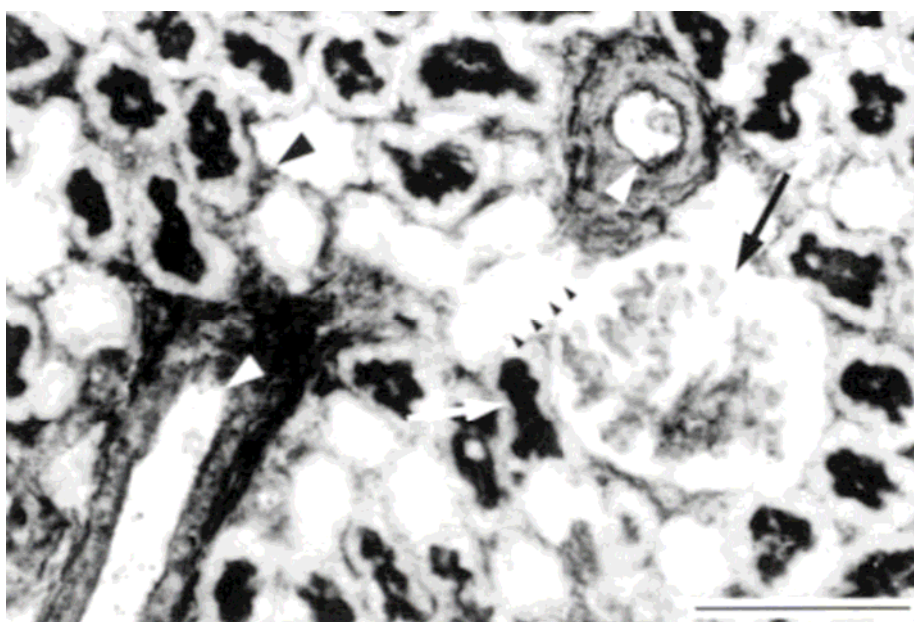
A mikrohullámú sugárzás tehát kis energia esetén is okoz, legalább 24 órán át tartó változást idegszövetben, ha ez a változás valószínűleg nem károsítja is a szövetet egyszeri kezelés esetében. A már szinte mindenki által használt használt rádiótelefonok esetében azonban nem beszélhetünk egyszeri-néhányszori alkalmazásról és a sugárzás időtartama is rendszeresen több lehet, mint napi egy óra. Épp ezért megnyugtató, hogy Ca-mozgásra utaló jelet a sugárzás hatásának leginkább veszélyeztetett területen, a hallókéregben sem találtunk GSM rádióhullámmal végzett besugárzás hatására, nem változott az ekto-ATPáz aktivitás eloszlása és más ATPáz megjelenését sem tapasztaltuk (16. ábra) ¹⁴⁴.



16. ábra Kalciumeloszlás kimutatása piroantimonátos reakcióval egér hallókérgén GSM rádióhullám alkalmazása után. A Ca-piroantimonátszemcsék a vezikulákban (v) és a citoszolban találhatók, a szinapszis (nyíl) nem tartalmaz csapadékszemcséket ¹⁴⁴ skála: 0.4 μ m

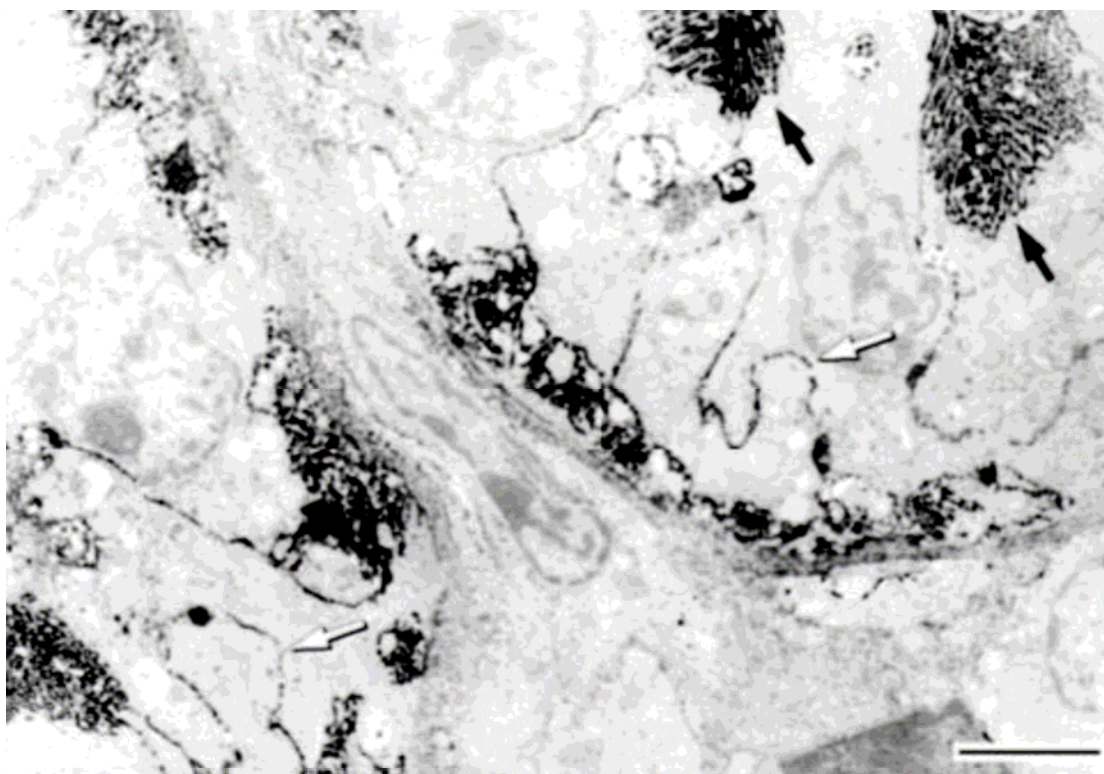
ATP-nek és bomlástermékeinek, elsősorban talán az adenzinnak és inozinnak, a P2 és az adenzinreceptoroknak, és így az ekto-ATPázoknak is nemcsak az idegszövetekben van kiemelt élettani szerepe. Az egyik olyan szerv, ahol az ATP hatását széles körben vizsgálják, a vese^{58,145-149}. Az ATP és a belőle származó adenzin a P1 és P2 receptorokon keresztül biológiai hatások együttesét váltja ki a vese mikrovaskulaturájában, a mezangiális sejtekben, glomerulusokban és az epitelsejtek által végzett szállítási folyamatokban.

Az emberi veséhez hasonló sertésvese kéregállományában végeztünk immun- és enzimhisztokémiai méréseket¹⁵⁰. A fagyasztott metszeten végzett enzimhisztokémiai reakció jól mutatta az ekto-ATPáz aktivitásban való különbséget az érgomolyag sejtjei és a vesetubulus sejtjei közt (17. ábra).



17. ábra Ekto-ATPáz aktivitás sertés vese kéregállományában. A kanyarulatos csatornák proximális szakasza (fehér nyíl) és az erek (fehér nyílhegy) festődnek legerőteljesebben, míg az érgomolyag kapillárisai (fekete nyíl) és a peritubuláris kapillárisok (fekete nyílhegy) gyengébb aktivitást mutatnak. A disztális tubulusok (kis fekete nyílhegyek) nem mutatnak enzimaktivitást¹⁵⁰ skála: 200 μ m

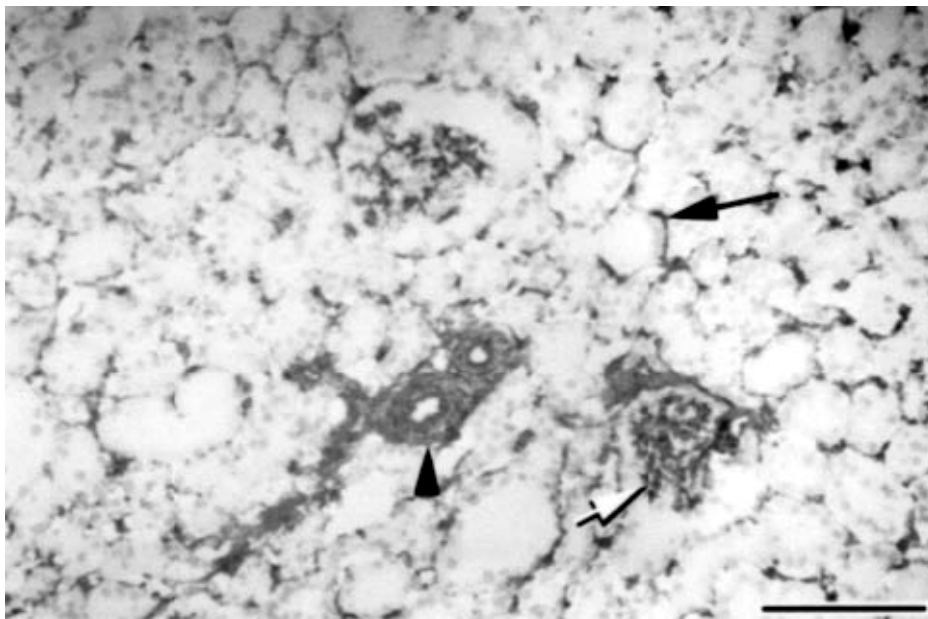
Az elektronmikroszkópos enzimhisztokémiai vizsgálat meggyőzően mutatta a kefeszegélymembrán, valószínűleg óriási felszínének is köszönhető hatalmas ekto-ATPáz aktivitását, és látható volt, hogy kisebb mértékben, de a bazolaterális membrán is rendelkezik ezzel az aktivitással (18. ábra).



18. ábra Ekto-ATPáz enzim jelenléte vesetubulus sejtekben (sertésszövet). A kefeszegélymembránon található csapadék mennyisége (fekete nyíl) igen nagy, de erőteljes aktivitás látható a bazolaterális membránokon is (fehér nyíl) ¹⁵⁰

skála: 10 μ m

A kétféle technikával végzett, házilag készült (*Raf Lemmens munkája*) mono-és poliklonális antitesteket felhasználó, fagyasztott és paraffinos metszeteken egyaránt végzett immunfestések eredményeként megállapítottuk, hogy sertés vesében legalább kétfajta ekto-ATPáz/ATPDáz van jelen. Az ekto-ATPDáz ellen termelt monoklonális antitest az erek falában, a peritubuláris kapillárisokban és az érgomolyag kapillárisaiban mutatta az ekto-ATPDáz jelenlétét (19. ábra).

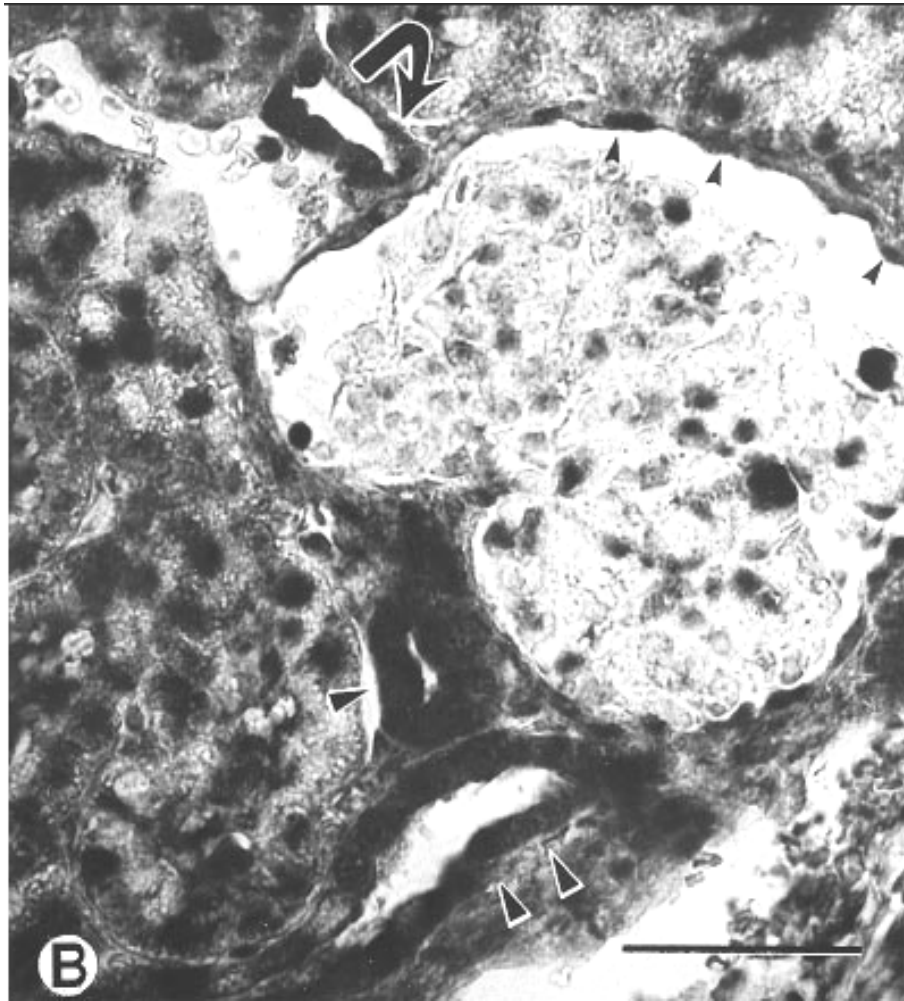


19. ábra CD39/NTPDáz1 ellen termelt monoklonális antitesttel végzett immunreakció sertés vese kéregállományának fagyasztott metszetén.

Immunreaktivitás az endotélsejteken és simaizomsejteken (fekete nyílhegy), valamint az érgomolyag (fehér nyíl) és peritubuláris kapillárisok sejtjein (fekete nyíl) ¹⁵⁰ skála: 200 µm

Az enzim molekula másik szakasza, a nukleozidfoszfátázokban megőrződött rész ellen előállított poliklonális antitestet alkalmazva, pozitív reakciót találtunk a proximális és disztális csatornában és az érgomolyag kapszulában is. Magukban a glomeruláris sejtekben azonban nem találtunk festődést (20. ábra).

A monoklonális antitesttel végzett festés és az enzimhisztokémiai reakció eredményének összevetése alapján azt mondhatjuk, hogy a kefeszegélymembránokban biztosan nem az NTPDáz1 található, hanem egy másik NTPDáz. Poliklonális antitesttel, amely az NTPDázok családjának több tagját is képes felismerni, azonban igazolni lehetett, hogy ott is egy NTPDáz van jelen. Egy 2005-ben közölt eredmény pedig minket igazolt, mikor a vesében kimutatták az NTPDáz1 és NTPDáz2 enzimeket ⁵⁸.



20. ábra Immunfestés ATPDáz ellen termelt poliklonális antitesttel sertés vese kéreg paraffinos metszetén. Immunreaktivitás a disztális tubulusokon (hajlított nyíl), proximális tubulusokon (nagy nyílhegyek) és a Bowman kapszulán (kis nyílhegyek) ¹⁵⁰ skála: 50 µm

A vese szinte minden sejtjéből származhat az extracelluláris térben lévő ATP, melynek bomlástermékeivel együtt szabályozó hatása van a vese működésére. Ezt a hatást modulálhatják az NTPDázok az extracelluláris nukleotidok és nukleozidok koncentrációjának szabályozásával, annál is inkább, mivel felderített eloszlási mintázatok párhuzamot mutat az ismert P2 receptorok eloszlásával.

A másik szerv, amiben az ekto-ATPázok-NTPDázok eloszlását vizsgáltuk, a hasnyálmirigy volt. Beaudoin és munkacsoportja, akik úttörő munkát végeztek az NTPDázok lokalizálásában – *ők leginkább az ekto-ATPDáz vagy apiráz nevet használták* -, először próbálkoztak ellenük antitesteket készíteni, s ott voltak a szerkezeti vizsgálatok kezdeteinél is, igen sok eredményt közöltek a hasnyálmirigyben előforduló ATPázokról ¹⁵¹⁻¹⁶¹. Még fontosabb indok volt, hogy újabb kísérleti adatok szerint a hasnyálmirigyben az NTPDázoknak stratégiai szerepe lehet olyan purinok által közvetített folyamatokban, mint a folyadék kiválasztás-elektrolit szekréció, simaizomösszehúzódnás vagy a véráram szabályozása ¹⁶²⁻¹⁷². Tengerimalac hasnyálmirigy külső elválasztású részének vizsgálata felfedte, hogy a duktuszsejtek lumenális oldalán ható nukleotidok autokrin vagy parakrin módon, de fokozzák a duktális szekréciót, míg ugyanezen, valószínűleg idegvégződésekből származó nukleotidok, a bazolaterális oldalon hatva már gátló hatásúak ¹⁶⁹. Az NTPDázok elhelyezkedésének megismerése, az itteni változások nyomon követése valamilyen patológiás folyamat vagy egyszerűen az öregedés során, tehát a purinerg szabályozásról is elárulhat valamit.

Különböző eredetű hasnyálmirigyszöveteket vizsgálva (egér, patkány, tengerimalac, ember) ^{21,173} arra is bizonyítékot kerestünk, jellemző-e az NTPDázokra a fajspecifitás. (Már a patkány és egér mediális habénulán kapott eredmények összevetésekor megfigyeltük, hogy a két fajból származó szöveteken az ekto-ATPáz eloszlási mintázata nem teljesen azonos ^{122,132}).

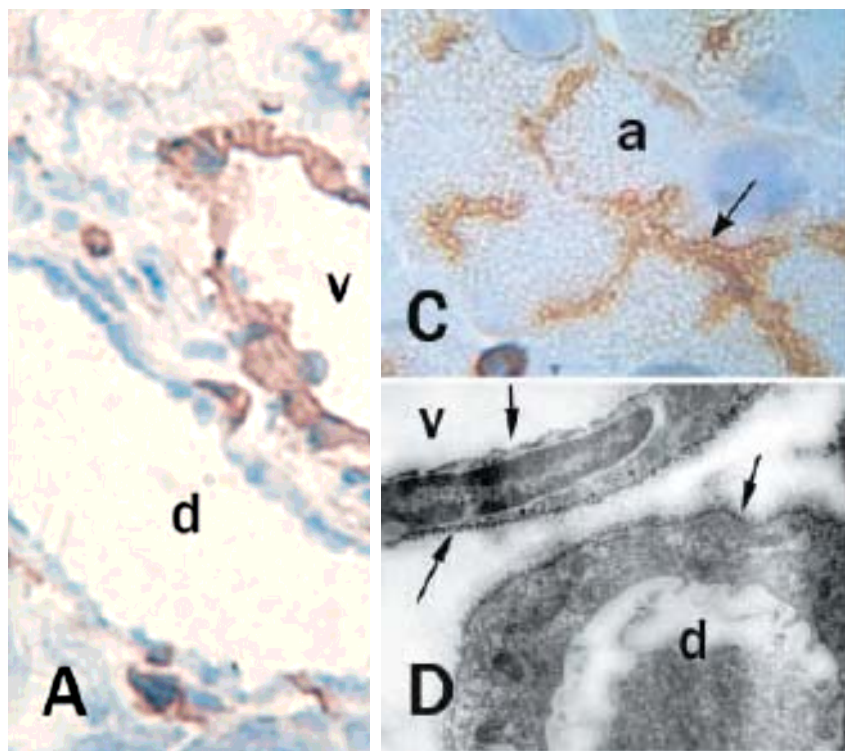
Hasonló témánk és Dr. S.C. Robson kutatócsoportjával való több éves együttműködésünk eredményeképpen nemcsak vad típusú, de CD39(NTPDáz1) génkiütött egér szövelein is dolgozhattunk. Kimutattuk az NTPDáz1 és 2 lokalizációját és aktivitásuk eloszlását, és megmértük az enzimaktivitásokat hasnyálmirigyen kívül a szintén a gasztrointesztinális rendszerbe tartozó nyálmirigyek közül a szubmandibuláris mirigyben is.

A vad típusú és CD39 génkiütött állat szerveiből készült biokémiai preparátumon Baykov módszere szerint elvégzett ATP- és ADPáz aktivitás mérések eredményei egyértelműen megmutatták, hogy mind a két mirigyben számolnunk kell az NTPDáz1-en kívül legalább egy másik NTPDáz jelenlétével. A génkiütött állat szöveteiben mért ADPáz aktivitás jelentős csökkenése a vad típushoz képest azt igazolta, hogy a szövetben az NTPDáz1 található a legnagyobb mennyiségben, az ATPáz aktivitás jóval kisebb mértékű csökkenése arra utalt, hogy az a másik NTPDáz ekto-ATPáz típusú kell legyen. A kapott értékek valószínűsítették azt is, hogy a pankreász és a nyálmirigy szöveteiben a két NTPDáz aránya különböző (4. táblázat) ²¹.

szövet	nmolP _i perc/perc*mg fehérje				Kísérletek száma
	WT		cd39 ^{-/-}		
	ATPáz	ADPáz	ATPáz	ADPáz	
hasnyálmirigy	115+/-20	31+/-7	69+/-13*	3.5+/-0.6**	6
szubmandibuláris mirigy	155+/-4	29+/-2	158+/-20ns	8.5+/-1.00**	3

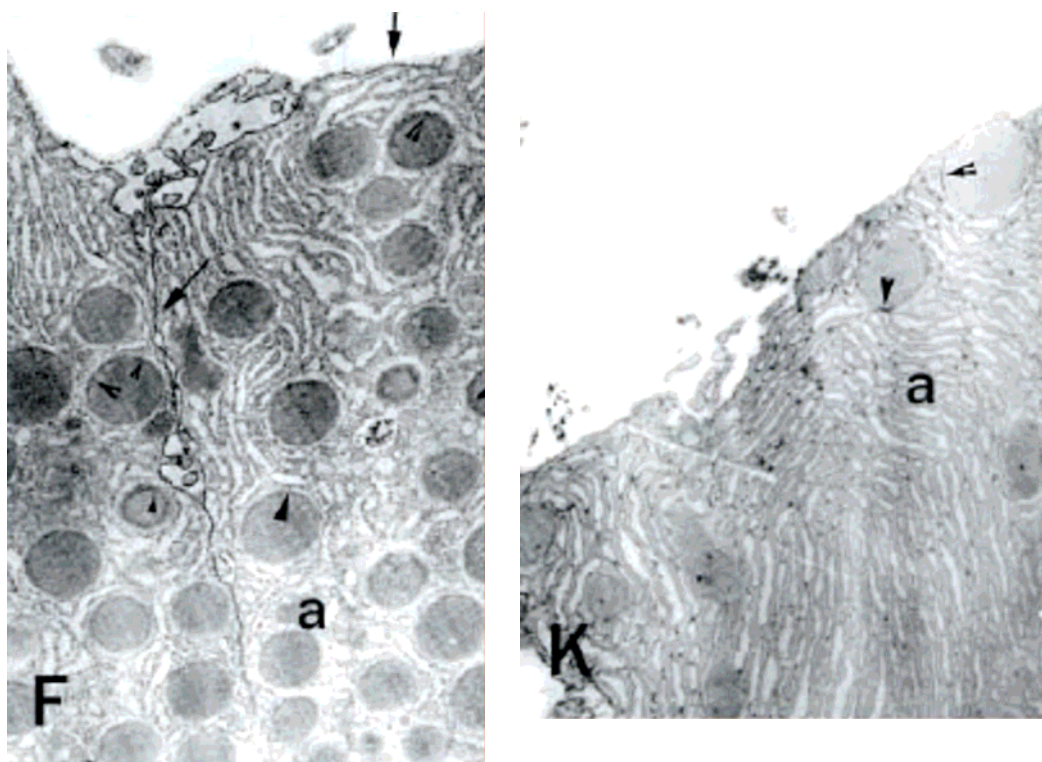
4. táblázat ATPáz és ADPáz aktivitások vadtípusú és cd39 génkiütött egér hasnyálmirigyében és nyálmirigyében. Minden mérést háromszor ismételtünk. Statisztika: Student t-teszt alapján. ns: nem szignifikáns, *: p<0.05; **: p<0.01

Hasnyálmirigyben az NTPDáz1-re kriosztátos metszeteken végzett fénymikroszkópos immunhisztokémia vizsgálat a fehérje jelenlétét mutatta endotélsejtekben, az acinusok lumenében, de a duktuszok epitélsejtjeiben nem. Az elektronmikroszkópos vizsgálat azonban feltárta, hogy a duktális epitélsejtek bazális oldala mégiscsak kifejezi az enzimet (21. ábra). Elektronmikroszkópos enzimhisztokémiai reakció ki is mutatta ott az ekto-ATPáz aktivitást ²¹.



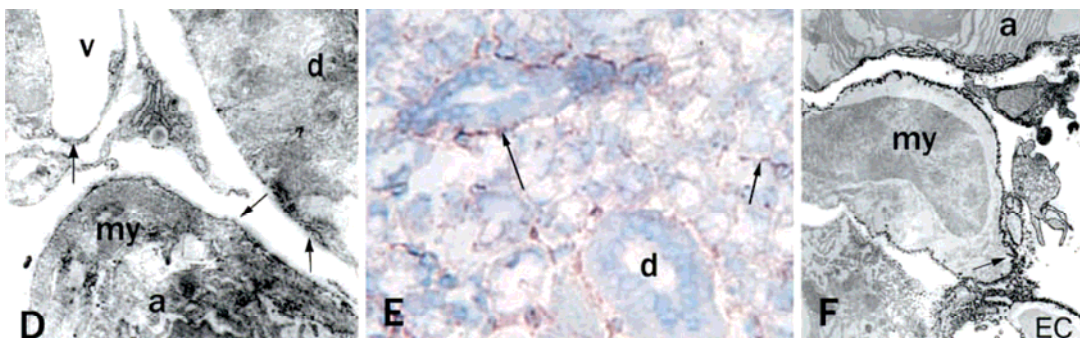
21. ábra NTPDáz1 immunfestés vad típusú egér hasnyálmirigyszöveten. A: Barna reakciótermék (DAB) jelzi az immunreaktív endotélsejteket (v). A ductuszok (d) epitélsejtjei nem jelöltek. C: Erőteljes reakció az acinussejtek lumenében NTPDáz1-re. (A,C: fagyasztott metszet) D: Az elektronmikroszkópos immunfestés NTPDáz1-re. Az endotélsejtek membránján kívül (v, nyílak) a ductális epitélsejtek bazális membránja is jelölt (d, nyíl).²¹

Az elektronmikroszkópos szinten végzett immunfestés eredménye szerint az acinusokban az enzim a bazális oldalon is jelen van, a biokémiai mérések eredményét pedig a cd39 génkiütött egér szövetén végzett enzimhisztokémiai reakció is alátámasztotta azzal, hogy bár megfigyatkozott mennyiségben, de volt ekto-ATP-áz aktivitást jelző csapadék az acinusok bazális membránján, sőt, némely granulum membránjában is (22. ábra).



22. ábra F: NTPDáz1 immunreaktivitás vad típusú egér hasnyálmirigyében szomszédos acinusok (a) bazolaterális membránján (nyíl) és több zimogénszemcse membránjában (nyílhegy). K: Maradék ekto-ATPáz aktivitást jelző ólomszulfid csapadék cd39 génkiütött egér hasnyálmirigyszövet metszetében az acinussejt membránján és több zimogénszemcse membránjában (nyílhegy) ²¹.

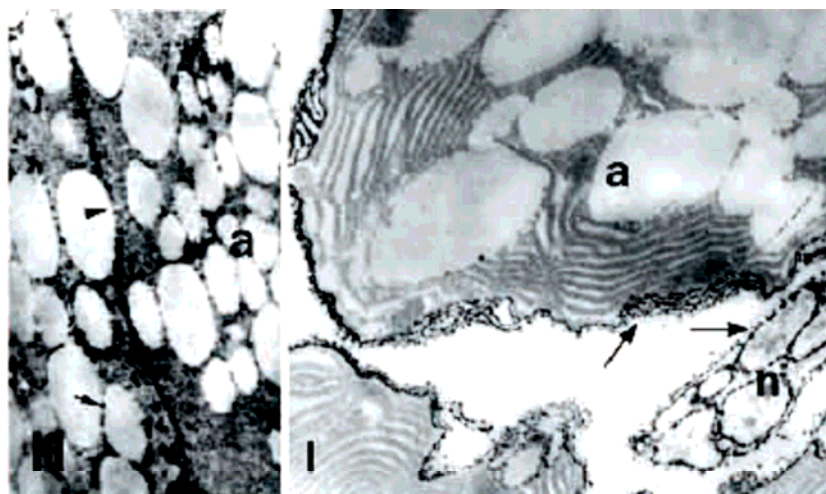
A hasnyálmirigy felépítéséhez hasonló szerkezetű szubmandibuláris nyálmirigyben az erek és a mioepitélsejtek igen erős immunreaktivitást mutattak és az enzimhisztokémiai reakció is ennek megfelelően erőteljes volt, míg a duktuszsejtek enzimaktivitása, a hasnyálmirigyben tapasztaltakhoz hasonlóan, alacsony volt. Az NTPDáz1 jelenlétét azonban az immunfestés a duktuszsejtekben is igazolta (23. ábra).



23. ábra Vad típusú egér, szubmandibuláris nyálmirigy szövet.

D: NTPDáz1 immunreaktív endotélsejtek az erek falában (v) és egy intralobuláris vezeték epitélsejtjének bazális oldalán (d). Jóval erősebb immunreaktivitást mutat az acinussejthez (a) tapadó mioepitélsejt (my). E: A duktális epitélsejtek nem, de a körülöttük levő sejtek és az erek (nyíl) enzimaktivitást mutatnak (fagyasztott metszet). F: Enzimhisztokémiai reakció eredménye elektronmikroszkópos szinten. Az acinus (a) –mioepitél (my) - és endotélsejtek (EC) igen határozott ekto-ATPáz aktivitást mutatnak ²¹.

A hasnyálmirigyben találthoz hasonlóan, több acinusban a mukózus szemcsék membránja is ekto-ATPáz aktivitást mutatott, és aktív enzim jelenlétét igazolta az idegvégződések membránján található csapadék is (24. ábra).



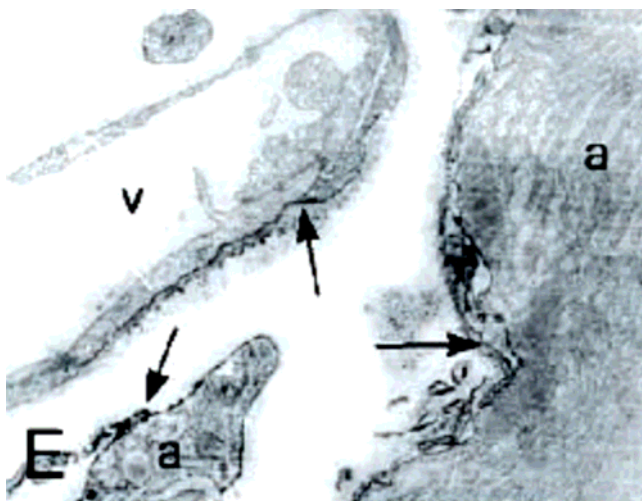
24. ábra Ekto-ATPáz aktivitást jelölő csapadék egér szubmandibuláris metszetében mukózus granulumok membránján (H, nyílhegyek). I: Az acinus membránja fedett

az ekto-ATPáz aktivitásra utaló csapadékkal, de a sejtben levő granulumok membránja nem mutat ekto-ATPáz aktivitást. Az idegvégződés (n) membránja ekto-ATPáz aktivitást jelez²¹.

Az, hogy ekto-ATPáz aktivitást nem minden esetben találtunk a granulumok membránján, összefüggésben lehet azzal, hogy maguk a szemcsék is különböznek egymástól, hiszen nem azonos fehérjét tárolnak. Az NTPDázok specifikusa ebben is megnyilvánulhat.

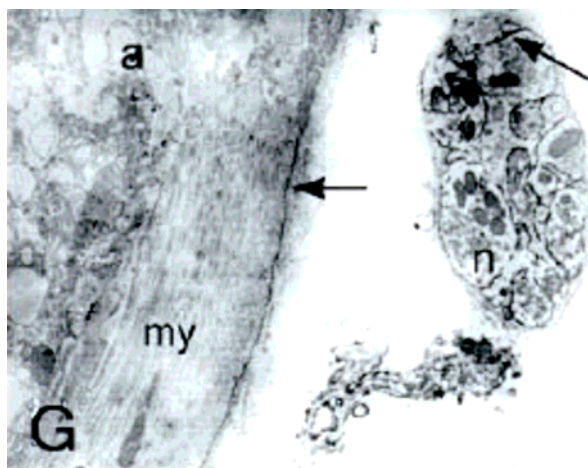
A fénymikroszkópos és elektronmikroszkópos enzimhisztokémiai eredmények közötti eltérés magyarázata azonban nem egyszerűen az elektronmikroszkópos kép nagyobb felbontása. A kriosztátos metszetek készítésekor fixálásra használt acetone és az elektronmikroszkópos metszetek megőrzöttségéhez nélkülözhetetlen aldehid típusú fixálók hatására a fehérjék eltérő konformációban rögzülnek és könnyen elképzelhető, hogy egy antitest nem tud a megfelelő epitóphoz kötődni. Annál is könnyebben hihető ez, ha elgondoljuk, az acinusok esetében milyen nagy fehérjekoncentrációval kell számolnunk. Enzimhisztokémiai vizsgálat esetében az enzimreaktivitás hiánya legkönnyebben a fixálás során fellépő vízvesztéssel magyarázható.

Az enzimhisztokémiai és NTPDáz1 immunreaktivitás eredmények közötti különbségek, s a génkiűtött állat szöveteiben az enzimhisztokémia mellett biokémiai méréssel is kimutatott ekto-ATPáz aktivitás, egy másik, NTPDáz2 típusú NTPDázra utalt. Jelenlétét NTPDáz2 immunfestéssel mind a két mirigyben igazoltuk is. Hasnyálmirigyben NTPDáz2 immunreaktivitást az endotélsejteknek és acinusoknak csak a bazális membránján találtunk, s ez az immunreaktivitás természetesen NTPDáz1 génkiűtött állat szöveteiben is kimutatható volt (25. ábra). Az endotélsejtek esetében eredményünk különbözött a Seigny és munkatársai által leírtaktól. Ők NTPDáz2 jelenlétét csak az erek támasztósejtjeinek membránján mutatták ki⁵⁷, endotélsejtekben nem. Az eltérés lehetséges magyarázata az NTPDázok fajspecifikus volta, hiszen más szöveten (máj) és más fajban (patkány és ember) dolgoztak.



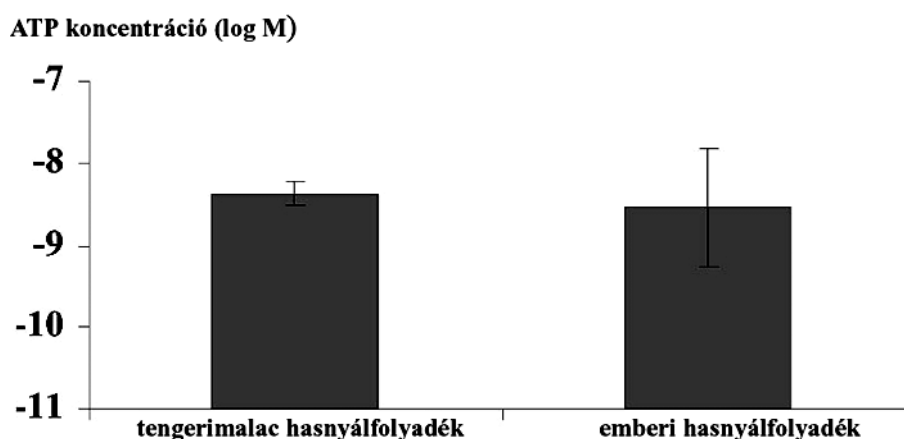
25. ábra NTPDáz1 génkültött egérből származó hasnyálmirigyszövet elektronmikroszkópos metszete. NTPDáz2-re festődés az endotélsejtek bazális oldalán és az acinusokban (nyilak) ²¹

Nyálmirigyben sem voltak immunreaktívak a ductusz epitélisejtek NTPDáz2-re, de, ahogy a pankréásban is, itt is megtaláltuk az enzimet az endotélsejtek bazális oldalán ill. a támasztósejt membránjában. Az egér nyálmirigyében található idegi elemek ekto-ATPáz aktivitása úgy tűnik, elsősorban az NTPDáz2-től származik (26. ábra).



26. ábra NTPDáz2 immunfestés egér nyálmirigyszövetének metszetén. Reakciótermék a mioepitélsejt membránján (my) és az idegvégződések membránján (n) ²¹

Az NTPDázok feltételezett fajspecifitásának bizonyításához patkány, tengerimalac és emberi pankréász szövetek ekto-ATPáz aktivitását és ekto-ATPáz eloszlását hasonlítottuk össze, és ezt kiegészítettük hasnyálminták ATP-tartalmának és ekto-ATPáz aktivitásának mérésével is ¹⁷⁴. Patkány hasnyálmintájában nem tudtunk ATP-t kimutatni, bár a biolumineszcenciás mérés érzékenysége igen nagy, 10^{-10} M. A tengerimalac és emberi hasnyálminták viszont hasonló mennyiségű ATP-t tartalmaztak (27.ábra).

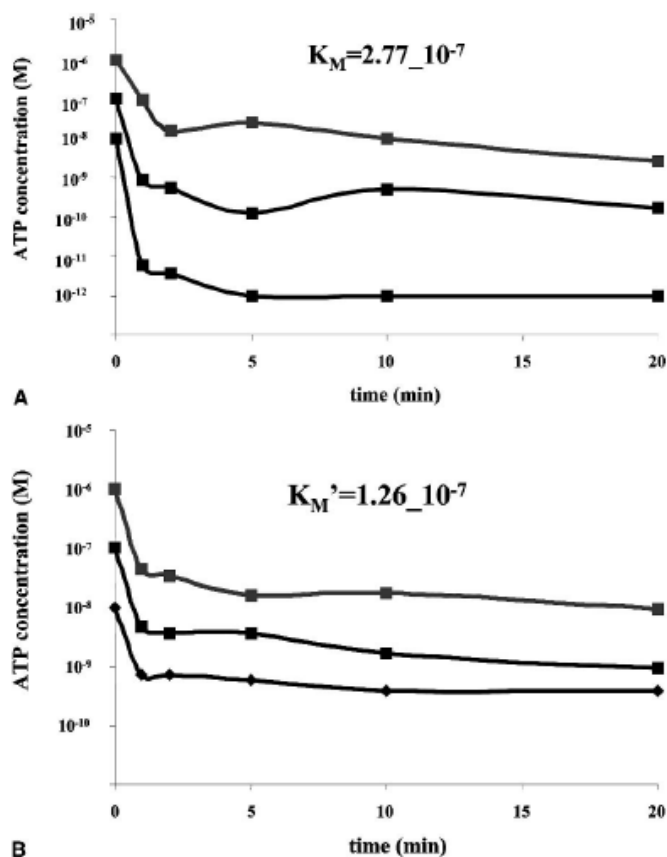


27. ábra Tengerimalac és emberi hasnyálminták ATP-tartalma ¹⁷⁴.

(n=10 ill. 6, átlag+/-SEM)

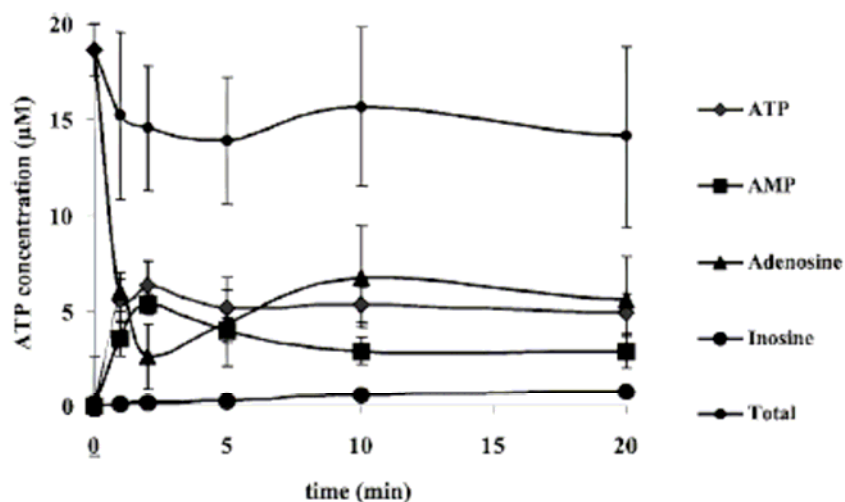
Mivel az ATP a hasnyálmirigy szekréciós sejtjeiből mindenképpen a hasnyálba kerül, az adatok alapján feltételeztük, hogy tengerimalac és emberi hasnyálban nincs jelen ekto-ATPáz enzim, viszont a patkány hasnyálában az enzim szolubilis változata megtalálható. Kívülről adtunk ATP-t a szekrétumhoz és mértük az ATP-koncentráció időbeli változását, HPLC technikával a bomlástermékek megjelenését. Az eredmények igazolták egy ekto-ATPáz jelenlétét, melynek kinetikai állandóit is kiszámítottuk (28. ábra). Meg akartuk határozni, milyen típusú NTPDázról van szó, ezért a méréseket Na-azid jelenlétében is elvégeztük. Az ATPDázok (ilyen pl. az NTPDáz1) és az ATPázok (pl. NTPDáz2) közötti megkülönböztetés meglehetősen nehézkes biokémiai mérésekben, mivel igazán specifikus gátlószert nem ismerünk, de a Na-azidra az NTPDáz1 érzékenyebb ^{175,176}. Patkány hasnyálában azonban nem okozott szignifikáns

különbséget a Na-azid jelenléte, így valószínű, itt egy NTPDáz2 – hőz hasonló enzim található¹⁷⁴.



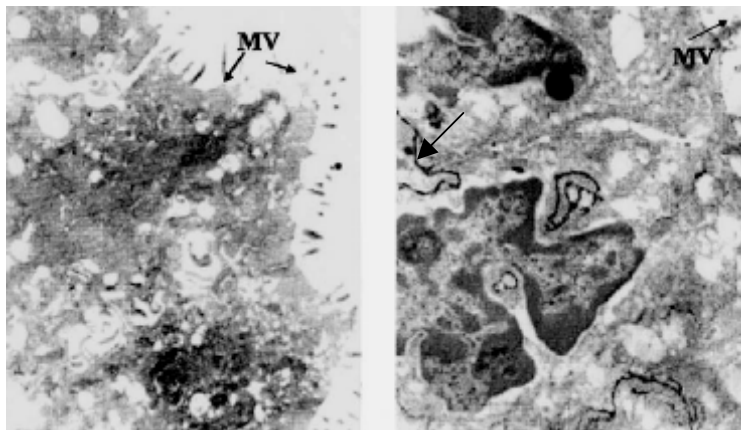
28. ábra Az ATP-koncentráció csökkenése patkány hasnyálfolyadékában. **A** kiszámított K_M érték három különböző kezdeti ATP-koncentráció esetében (A, hat önálló mérésből egy). **A fentiekkel azonos kezdeti ATP-koncentrációk, 10 mM Na-azid (B, minta 5 önálló mérésből)**¹⁷⁴.

A HPLC mérés előtt 20 μ M ATP –t adtunk a patkány hasnyálhoz. Az ATP gyors bomlása mellett az adenosinkoncentráció még sokkal gyorsabb és kétirányú változását figyeltük meg (először igen gyors csökkenés majd ismét növekedés). Az ATP és bomlástermékei között kb. tizenöt perc után állt be az egyensúlyinak tűnő állapot (29. ábra)¹⁷⁴.



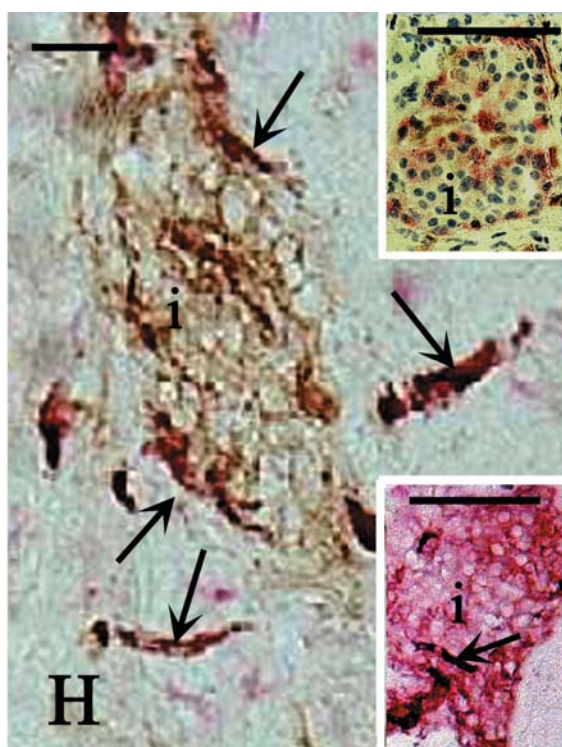
29. ábra Az ATP és bomlástermékeinek HPLC-vel történő mérése¹⁷⁴

Elektronmikroszkópos enzimhisztokémiai vizsgálatokat is végeztünk az emberi hasnyálhoz hasonló összetételű folyadékot szekretáló tengerimalac hasnyálszövetén és a patkány hasnyálszövetén is. A hasnyál kiválasztásában elsősorban részvevő duktális epitélisejtek ekto-ATPáz aktivitást csak a patkányszöveten mutattak, ezzel is igazolva a két ill. három szövet purinerg szabályozása közti különbséget (30. ábra).



30. ábra Ekto-ATPáz aktivitás kimutatása cériumos reakcióval. bal oldal: jelöletlen mikrovillusok tengerimalac duktuszsejtjein (MV, nyilak). Jobb oldal: A duktuszsejtek bazális membránja és a mikrovillusok membránja is jelölt patkány hasnyálmirigyszövetében (MV, nyíl)¹⁷⁴

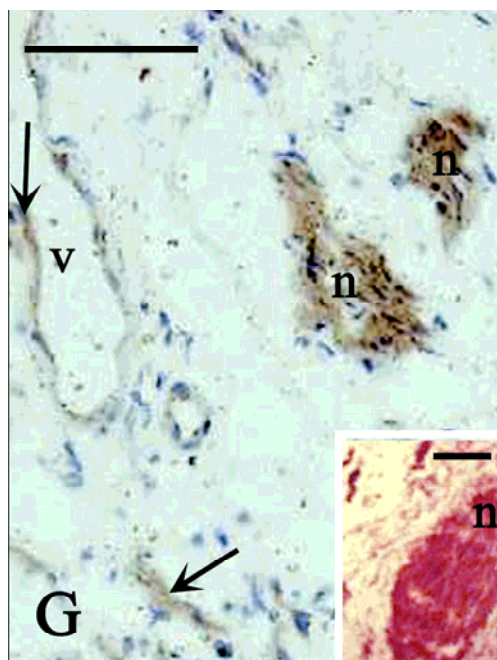
A hasnyálmirigyműtétekből származó emberi szöveteken elektronmikroszkópos vizsgálatot a minta tárolása (folyékony nitrogénben, majd $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) miatt nem végezhattünk, de összehasonlítottuk az ekto-ATPáz aktivitással rendelkező enzimek eloszlását egészséges és tumoros mintákon és azonosítottuk az NTPDáz1 enzimet. Igazoltuk az enzim expresszióját a Langerhans-szigetek bétasejtjeiben, melyekről már ismert volt, hogy purinoceptorokat expresszálnak ¹⁷⁷⁻¹⁷⁹. Az extracelluláris ATP-t hidrolizáló lánc ezzel teljessé vált, hiszen az 5'-nukleotidáz és az AMP receptorok jelenlétét már kimutatták ebben a szövetben ¹⁸⁰⁻¹⁸³ (31. ábra).



31. ábra Enzimhisztokémiai festés ekto-ATPáz aktivitás kimutatására emberi hasnyálmirigyszövet fagyasztott metszetén. A Langerhans-szigeten (i) belül és körül található vérerek (nyíl) és a sziget több sejtje is aktív enzimet expresszál. Felső ábra: Kettősfestés, enzim- és immunhisztokémia. A barna csapadék az enzimaktivitást jelzi, a piros szín a chromograninra festődött bétasejteket. Több sejt is kettős festődést mutat. Alsó ábra: Erőteljes immunreaktivitás NTPDáz1-re.

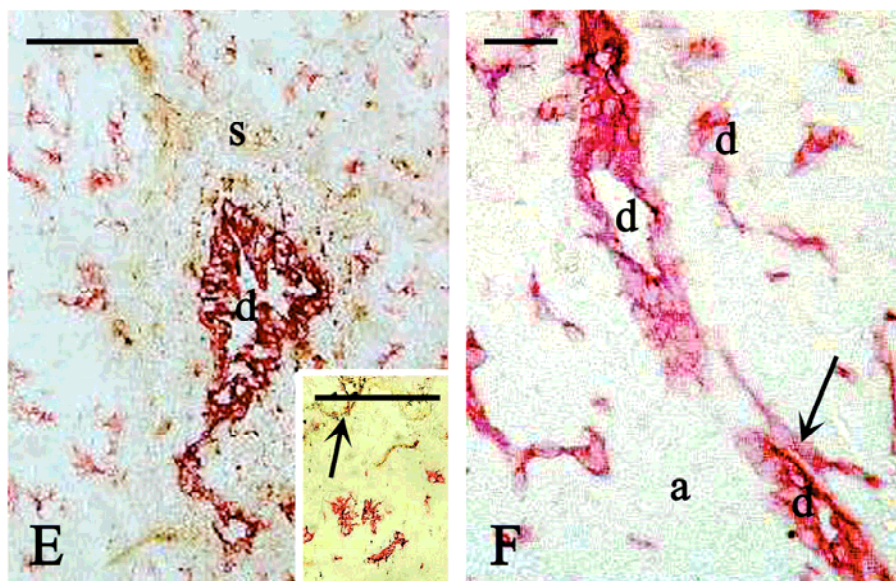
Látható, hogy az enzim-és immunreakció eredménye nem minden esetben fedi egymást, azaz az NTPDáz1 jelen van, de nem aktív. Bár maga a fixálás is csökkenti az

enzimaktivitást, feltehető, hogy az enzimaktivitás hiánya nem a fixálás következménye, hiszen erekben is, idegekben is ki tudtuk mutatni az aktív enzimet. Az idegi elemeken az ekto-ATPáz aktivitást mint az NTPDáz1-ből származót azonosítottuk (32. ábra). (Ez az eredmény eltér az egérszöveten találttól, ahol az idegi elemek NTPDáz2-t fejeztek ki.)



32. ábra Idegi elemek (n) ekto-ATPáz aktivitását jelzi a barna csapadék emberi hasnyálmirigyszövet fagyasztott metszetén. Nyíl: erek aktivitást mutató endotélsejtjei. (haematoxinin háttérfestés). Kis kép: Immunreakció NTPDáz1-re. Az idegi elemek erőteljesen festődnek ¹⁷³. skála: 60 μ m

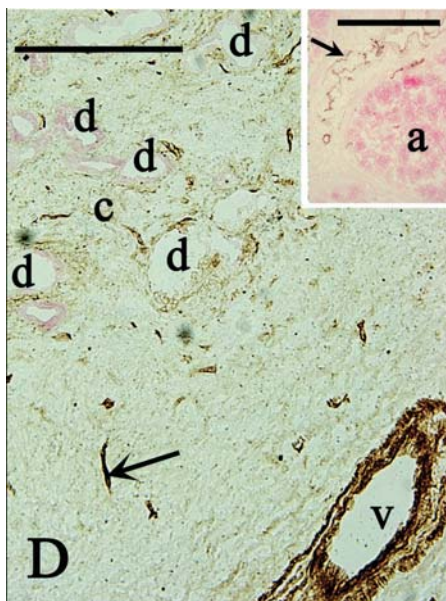
Duktuszokban nem találtunk enzimaktivitást, de az immunreakció itt is kimutatta az NTPDáz1 jelenlétét (33. ábra). Az NTPDáz1 fajspecifitását igazolja az is, hogy emberi hasnyálmirigymetszetek acinusain sem enzim-, sem immunreakcióval nem tudtuk jelenlétét kimutatni, bár patkány, sertés hasnyálmirigyében ezt leírták ^{152,170,184}.



33. ábra E: Enzimhisztokémia és LP2K immunfestés duktális epitelsejtek azonosítására emberi, egészséges pankréaszszövet fagyasztott metszetén. Csak az erek ill. a nagy duktusz (d) körüli simaizomsejtek (s) mutatnak ekto-ATPáz aktivitást. Kis kép: Hasonló kettősfestés tumoros szöveten. Az egészséges mintától eltérően, itt nincs a vezeték körüli simaizomsejtekben enzimaktivitás.
F: Immunfestés NTPDáz1-re. Az acinusok (a) nem mutatnak immunreaktivitást, a duktális epitelsejtek jelölődtek ¹⁷³. skála:60 µm

A műtétek során kivett szövetdarabok általában mind egészséges, mind tumoros részeket tartalmaztak. Az elváltozások alapján patológusok állapították meg, hogy egy-egy minta tartalmaz-e tumort. Ha a minta tárolási módja meg is akadályozta elektronmikroszkópos felvételek készítését, a fénymikroszkópos festések eredményéből arra következtethettünk, hogy az *erekben* talált NTPDáz1 expressziója független a szövetben lezajló rákos transzformációtól. A tumoros elváltozások és az NTPDázok kapcsolatának ellentmondásos kérdései ¹⁸⁵⁻¹⁸⁷ azonban itt is felvetődtek. Az egészséges és tumoros mintákban talált ekto-ATPáz aktivitás - NTPDáz1 eloszlás összehasonlításakor ugyanis még egy jelenségre figyeltünk fel. Az adenokarcinoma jellemző tünete a duktuszproliferáció. A duktuszok sejtjei ugyan sem az egészséges, sem a tumoros szövetben nem mutattak ekto-ATPáz aktivitást, de egészséges szövetben a körülöttük

lévő simaizomsejtek tartalmazták az aktív enzimet, míg tumoros szövetben, nem, vagy csak igen csekély mértékben találtunk erre utaló aktivitást az újonnan képződött csatornák körül. Az egészséges szövetben kötőszöveti sejteken szintén megfigyelhető aktív enzim a rákos mintákból teljesen hiányzott (34. ábra) .



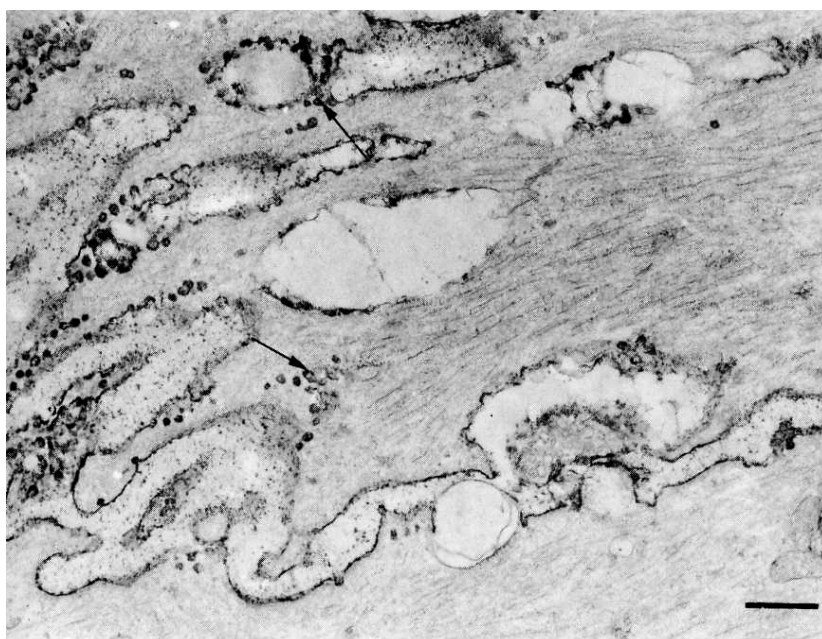
34. ábra Emberi tumoros hasnyálmirigyszövet. Az endotél –és az ér melletti simaizomsejtek jelentős, a duktuszok körüli kötőszöveti sejtek igen gyenge ekto-ATPáz aktivitást mutatnak. A duktuszproliferáció (d) tipikus jele az adenokarcinomának. Kettősfestés: enzimhisztokémia ekto-ATPáz aktivitás kimutatására, amilázfestés az acinusok azonosítására. Csak a nyíllal jelzett erek mutatnak enzimaktivitást, az acinusok nem ¹⁷³. skála: 60 µm

Tudjuk, hogy az ektonukleotidáz enzimek együttes munkája fontos tényezője az élettanilag szükséges extracelluláris ATP és adenzin koncentráció biztosításának. Emberi hasnyálmirigyszövet esetében azt tapasztaltuk, az NTPDáz1 aktivitása a tumoros szövetben lecsökkent. Ez lehet magának a tumoros átalakulásnak a következménye, de az NTPDáz1 hiánya is elősegítheti a további tumoros elváltozásokat azzal, hogy az ATP és bomlástermékeinek koncentrációja már kevésbé van kontrollálva. Egy olyan sejttípusban, a simaizomsejtekben figyeltük meg az ekto-ATPáz aktivitás csökkenését,

melyről ismert, hogy sok kaveolát tartalmaz, a kaveolákról pedig mi mutattuk ki először, hogy gazdagok aktív ekto-ATPáz enzimben¹⁸⁸, amit azonosítottunk is, mint NTPDáz1-et^{20,189}. Lehetséges, hogy a kaveoláknak, elsősorban szerkezeti fehérjéknek, az NTPDáz1-et is megkötő kaveolinoknak szintén szerepe van a tumoros elváltozásokban? Részletesebben meg kellett vizsgálnunk magukat a kaveolákat és a kaveolák-ekto-ATPázok/NTPDázok kapcsolatát.

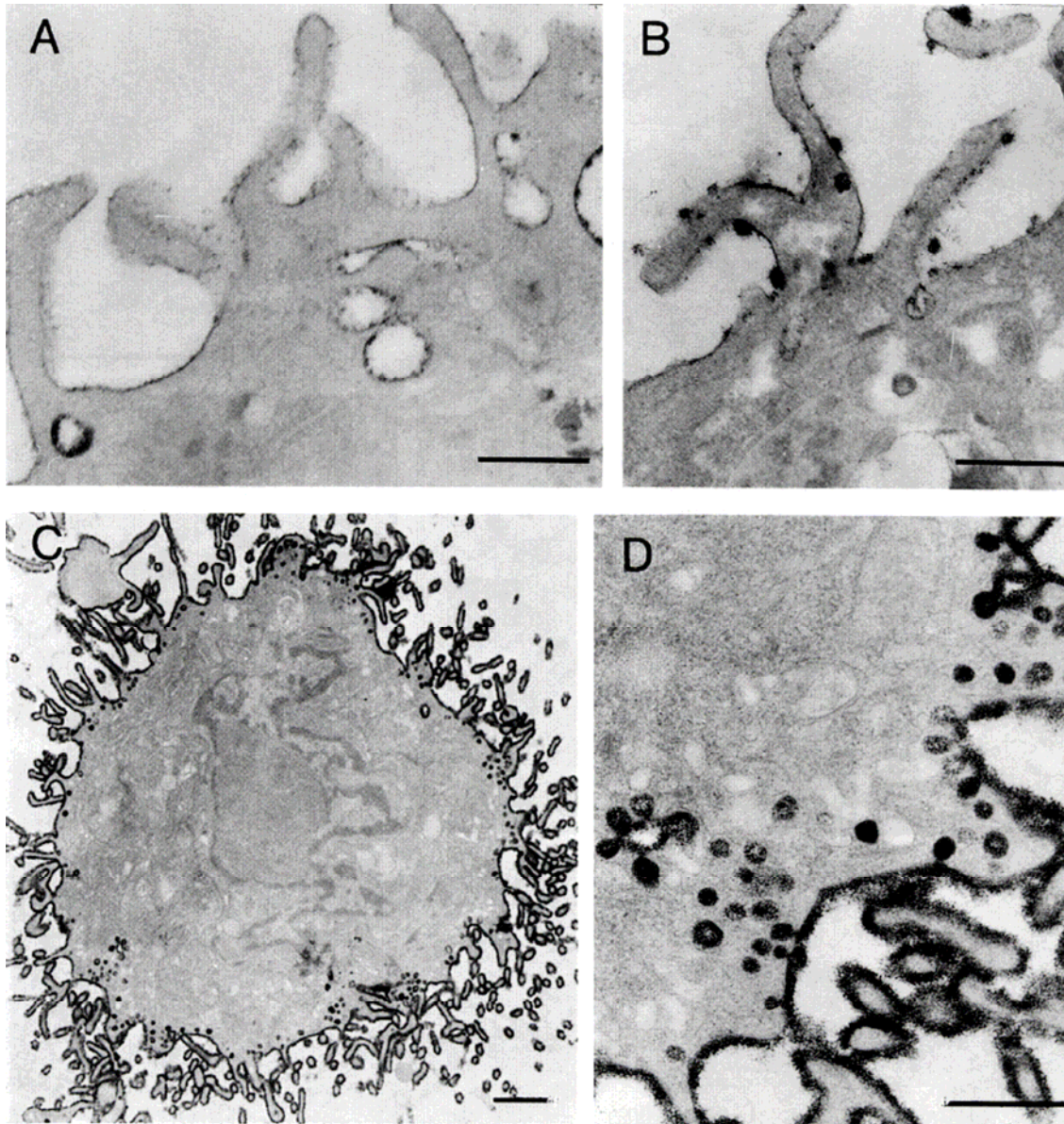
KAVEOLÁK, EKTO-ATPÁZ AKTIVITÁS, NTPDÁZOK

A kaveolákról, mint jelátvitelben szerepet játszó “központokról” 1993-ban jelent meg az első, vitát ébresztő cikk¹⁹⁰. Az itt lejátszódó folyamatok pontos mechanizmusát még ma sem ismerjük, de tudjuk, hogy a kaveolákban a jelátvitel egyik kulcsenzime, az endoteliális nitrogénmonoxid szintáz (eNOS), több G-fehérje kapcsolt receptor, kalciumáramlás szabályozó fehérje, vagy a jelátviteli útvonalakban kiemelt szerepet játszó protein kináz C (PKC) koncentrációja a többszöröse annak, mint amely a sejtmembrán kaveolamentes részében található^{19,81,82,94,191-204}. E témakörben egyik első eredményünk volt, hogy kimutatuk simaizomsejtek kaveoláinak erőteljes ekto-ATPáz aktivitását (35. ábra)¹⁸⁸.



35. ábra **Ekto-ATPáz aktivitás simaizomsejtekben**⁴⁶ (patkány, vas deferens, nyíl: kaveolák) skála: 0.4 μm

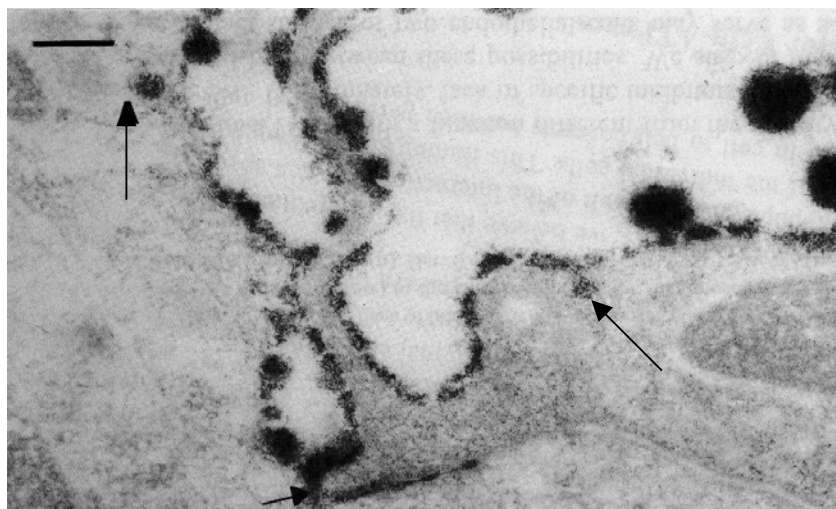
A makrofágokban szintén leírtak kaveolához hasonló membránbefüzdődéseket. Patkány elicitált makrofágjait vizsgálva kapcsolatot találtunk a sejtek kaveolában vakó gazdagsága, ekto-ATPáz aktivitása és a morfológiai altípusok között (36. ábra).



36. ábra Ekto-ATPáz aktívás különböző altípusba tartozó elicitált patkány makrofágok sejtmembránján és kaveoláiban ²⁰⁵ skála: A,B,D: 0,5 μ m, C: 1 μ m

Voltak makrofágok, melyeken egyáltalán nem találtunk kaveolát (36. ábra A), s itt az ekto-ATPáz aktivitást jelző csapadék egyenletesen oszlott el a sejtmembránon. Más

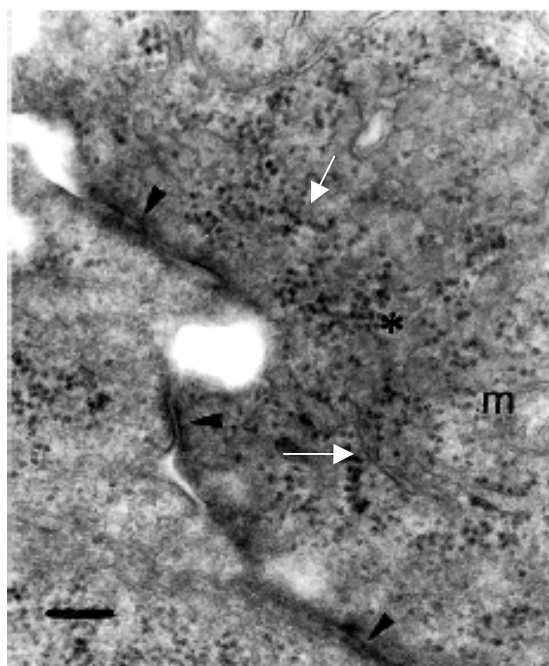
sejtek membránján a csapadék eloszlása „hópehelyszerű” lerakódásokat mutatott, egyenetlen volt (36. ábra B). Az ilyen makrofágokban is találtunk néhány kaveolát, de lényegesen kisebb számban, mint a harmadik típusba soroltaknál, amelyek a legnagyobb össz-ekto-ATPáz aktivitással rendelkeztek és sok kaveolát tartalmaztak, telve az enzimet jelző csapadékkal (36. ábra C-D). Arról, hogy vajon a kaveolák a sejtmembrán dinamikus változó részecskéi vagy sem, megoszlanak a vélemények, de a kezdeti elképzelésekkel szemben ma az az általánosan elfogadott álláspont, hogy meglehetősen stabil képződmények ²⁰⁶. Megfigyeléseink alapján feltételezzük, hogy a kaveolák képződése összhangban van a sejtek állapotával, megjelenésük része lehet a sejt valamilyen külső ingerre adott válaszának. Ez az eredményeink alapján kialakult feltételezésünk összhangban van a többiek által elfogadott kijelentéssel is, hogy a kaveolák funkciója függhet környezetüktől és ingerek hatására is képződhetnek ill. internalizálódhatnak. Endotélsejteken kapott eredményeink mindenesetre ezt látszanak igazolni. Az „*in situ*” módszerünkkel végzett enzimhisztokémiai festés kiválóan mutatja patkány aorta endotélsejtjeinek erőteljes ekto-ATPáz aktivitását (37. ábra).



37. ábra Patkány aorta endotélsejtek. A nyilak kaveolákat és bennük az ekto-ATPáz aktivitásra utaló cériumfoszfát csapadékot jelölik ⁴⁶ skála: 0,15 µm

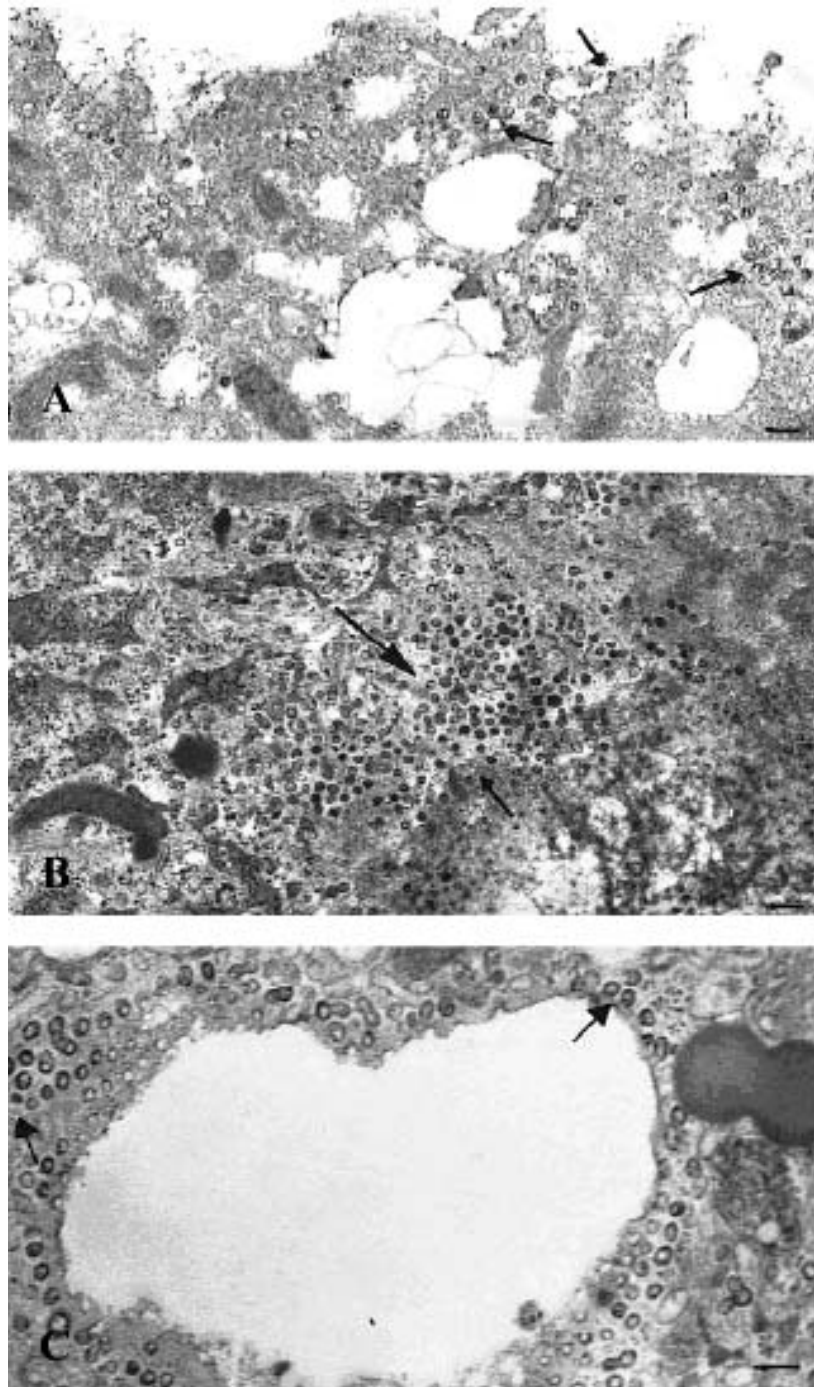
Az endotélsejtek azt a jellegzetességüket, hogy sok kaveolát tartalmaznak, ugyan még tenyészetben, *in vitro* körülmények közt is megtartják, mint azt agyi kapilláris

endotélsejtek tenyésztete tanúsítja ²⁰⁷ (38. ábra), **de** megfigyelhető, hogy ilyen körülmények közt a kaveolák nagy tömege a sejtek belsejében található – azaz a kaveolák megjelenése és a külvilágból kapott jelzések közt valóban lehet kapcsolat!



38. ábra Agyi kapilláris endotélsejtenyészet ²⁰⁷. A két szomszédos sejt között (nyílhegy) kialakulnak a sejtkapcsoló struktúrák (tight junction) kezdeményei, kaveolákat azonban csak a sejtek belsejében találunk (nyíl) (m: mitokondrium, *: endoplazmás retikulum, skála: 0.2 μ m)

Hasonlóképp a sejtek belsejében találhatók a kaveolák emberi köldökvéna endotélsejtenyészetének (HUVEC) sejtjeiben is. Az enzimhisztokémiai reakció itt is igazolta a kaveolákban lévő ekto-ATPáz aktivitást (39. ábra A), amit az NTPDáz1 enzimhez rendelhattunk, mivel az elvégzett immunreakció eredménye az enzimhisztokémiaival azonos eloszlást mutatott (39. ábra B). A vezikulákról kaveolin1 ellen termelt antitesttel végzett immunfestés igazolta, hogy kaveolák (39. ábra C).

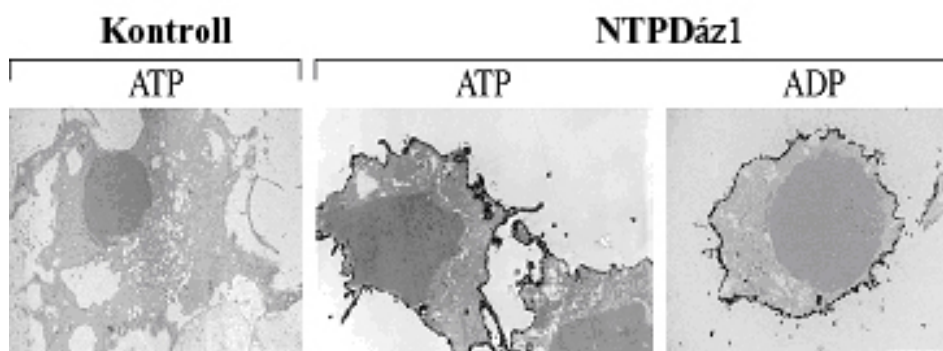


39. ábra HUVEC sejtenyészen végzett enzimhisztokémia ekto-ATPáz aktivitás kimutatására (A), immunhisztokémia NTPDáz1 azonosítására (B) és kaveloin1-re (C) ¹⁸⁹(a nyilak a jelölt kaveolákat mutatják; skála: 250 nm)

Azt tehát, hogy a kaveolák megjelenési formája függhet a környezeti hatásoktól, alátámasztva látjuk. Eddigi kísérleti eredményeink azt is mutatták, hogy a kaveolák megjelenési helye változhatott ugyan, de ez az ekto-ATPáz aktivitással bíró NTPDáz1 enzimre ez nem volt kimutatható hatással.

Itt több kérdés is felmerül. Minek az eredményeképp kapcsolódik az NTPDáz1 a kaveolákhoz? Megnö-e a sejt aktivitása, ha valamilyen inger hatására megnő a kaveolák száma?

Olyan sejtvonalon végeztünk kísérleteket, melynek eredeti ekto-ATPáz aktivitása igen alacsony. A választott majom vese epithelsejtekből származó COS-7 sejtekben kaveolákat is csak elvétve találtunk. A sejteket különböző NTPDáz1cDNS-sekkel transzfektáltuk, mire ATPáz és ADPáz aktivitásuk jelentősen megnőtt, ugyanakkor megnőtt a sejtben lévő kaveolák száma is, ahogy már az elicitált patkány makrofágok esetében is tapasztaltuk! A kaveolákban pedig enzimhisztokémiai reakcióval igazoltuk az ekto-ATPáz enzim jelenlétét (40. ábra). Az enzimaktivitásról egy másik kísérletsorozatban immunfestéssel bizonyítottuk, hogy az NTPDáz1 enzimhez tartozott ²⁰. Ezt az eredményt úgy értelmeztük, mint ami a kaveolák és az NTPDáz1 közötti kapcsolat élettani funkcióját támasztja alá.

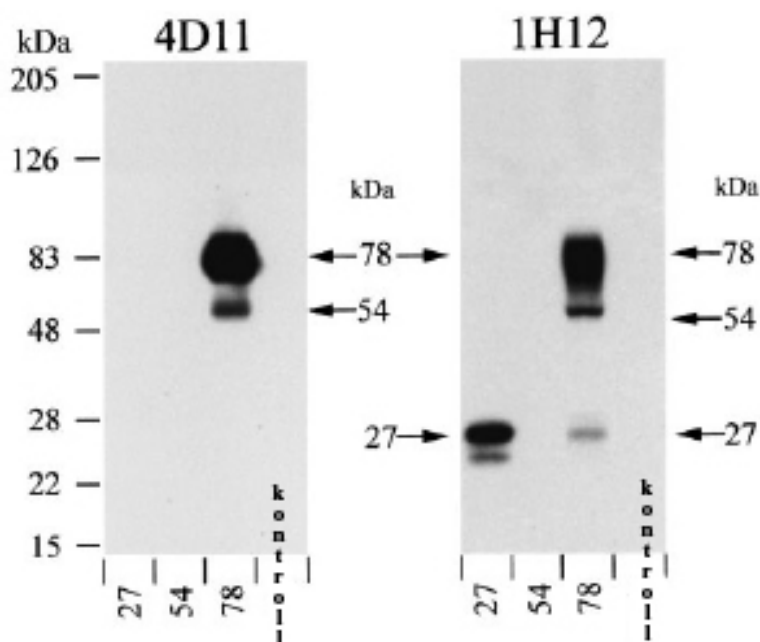


40. ábra Ólomfoszfát csapadék mutatja a teljes NTPDáz1cDNS-sel transzfektált COS-7 sejtek ekto-ATPáz és ADPáz aktivitását ²⁰⁸ skála: 10 μ m

Az irodalomban ATPDáz néven (jelenleg NTPDáz1) 78 és 54 kDa-os molekulásúlyú molekulákat is leírtak ¹⁷⁵. Ezek a formák az NTPDázokra jellemző, az enzim aktív centrumát tartalmazó APR régió szerkezetében különböznek egymástól. A COS-7 sejteket különböző NTPDáz1 konstrukciókkal transzfektálva sikerült igazolnunk, melyik forma rendelkezik természetes ATPáz aktivitással.

A transzfektálásra használt konstrukciók a 78 és 54 kDa-os mellett egy 27 kDa-os fehérjét is expresszáltak. A hasítási termék *in vivo* megjelenésének az enzimaktivitás megváltozása miatt patológiai jelentősége is lehet.

Western blot analízis kimutatta, hogy az 54 kDa-os konstrukcióval történő transzfektálás nem eredményezte az 54 kDa-os termék megjelenését, a 78 kDa-os konstrukcióval történt transzfektáláskor viszont nemcsak a várt 78 kDa-os, de az 54 kDa-os termék is megjelent (41. ábra).



41. ábra Eltérő CD39cDNS-ekkel transzfektált COS-7 sejtek membránfrakcióján végzett Western blot analízis ²⁰⁸. (A monoklonális 4D11 és 1H11 antitesteket az NTPDáz1 különböző epitópjai ellen Raf Lemmens (LUC, Diepenbeek, Belgium) készítette)

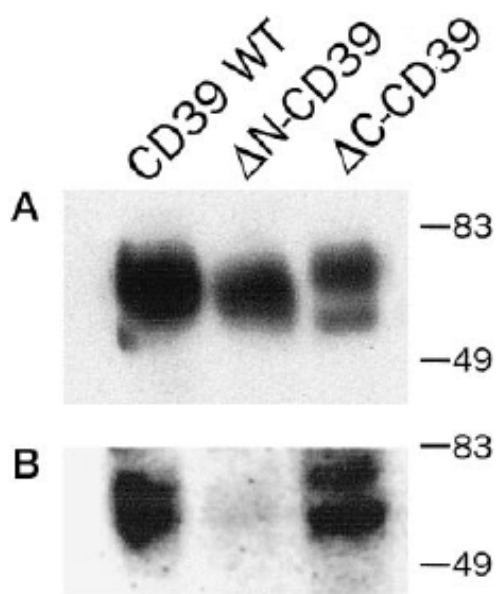
Az enzimhisztokémiai vizsgálat is ezzel megegyező eredményt adott, hiszen csak a teljes cDNS-sel transzfektált sejtek esetében láthattuk az ekto-ATPáz ill. ekto-ADPáz aktivitásra utaló csapadékot. Valószínűnek tartjuk, hogy ez az 54 kDa-os termék a szövetek proteolitikus aktivitásának következménye. Ezt a feltevést az igen magas a proteolitikus aktivitással rendelkező pankreász szövetben kapott kísérleti eredmény igazolhatja, ui. hasnyálmirigyben csak az 54 kDa-os fehérjét találták meg²⁰⁸.

A transzfektálás hatását az enzimaktivitásra meg is mértük. A mérésekhez a sejteket 72 órával a megfelelő cDNS-sel történő transzfektálás után tápfolyadékkal mostuk, majd a reakcióeleggyel, mely 2 mM ATP-t vagy ADP-t tartalmazott, inkubáltuk. Kontrollként nem transzfektált sejteket használtunk. Az eredmények 7 kísérlet átlagát mutatják (5. táblázat.)

		nmol P _i /10 000 sejt.h	
		ATP	ADP
Időleges transzfektálás	kontroll	3.4 ± 0.1	1.4 ± 0.1
	78	42.1 ± 2.4	19.7 ± 0.4
	54	1.8 ± 0.2	0.8 ± 0.1
	27	5.3 ± 0.5	2.2 ± 0.2
	54+27	2.3 ± 0.2	1.0 ± 0.1
	pcDNS	3.4 ± 0.3	1.7 ± 0.2
Stabil transzfektálás	78	14.4 ± 1.1	6.5 ± 1.0
	54	5.3 ± 0.5	1.5 ± 0.1
	27	1.8 ± 0.1	0.5 ± 0.1
	54+27	5.8 ± 0.3	1.5 ± 0.3
	pcDNS	6.1 ± 0.6	1.9 ± 0.3

5. táblázat CD39 és különböző CD39 csonkolt fehérjék cDNS-ével transzfektált COS-7 sejtek ATPáz és ADPáz aktivitása

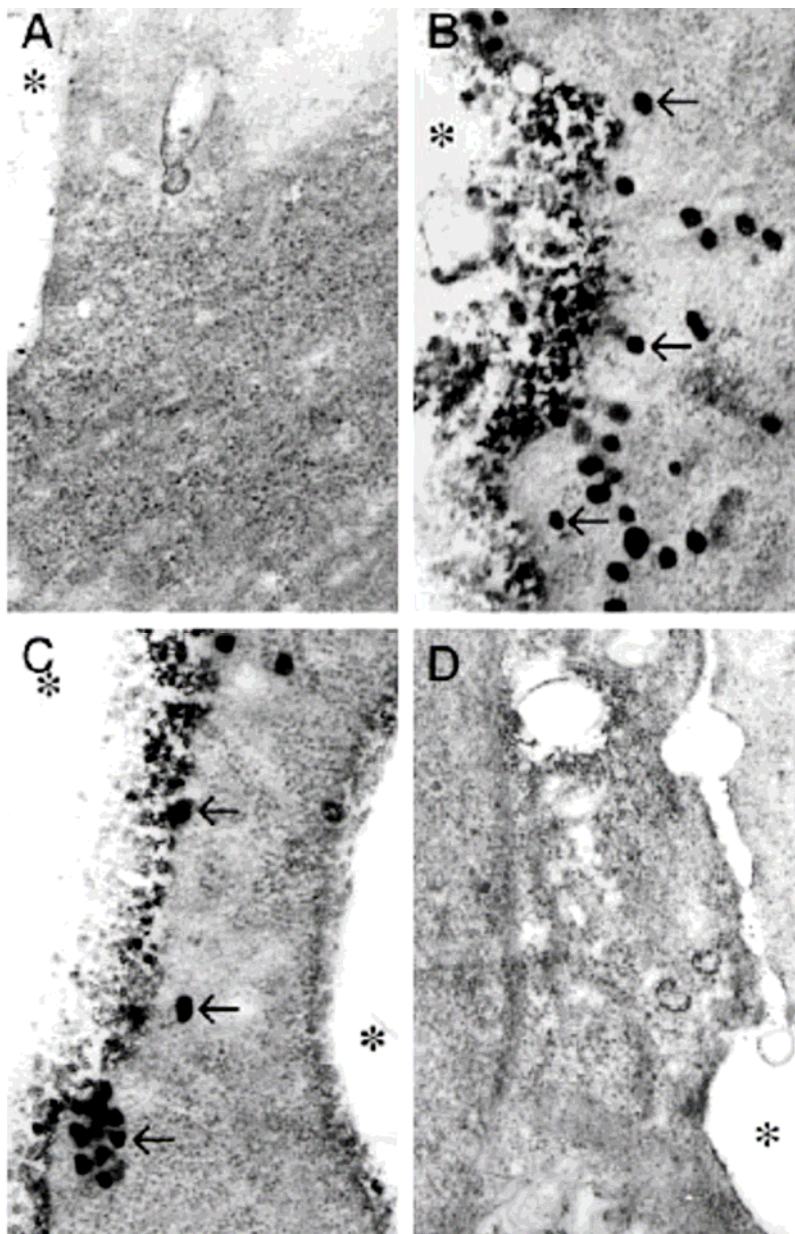
További, mutáns CD39/NTPDáz1cDNS-ekkel, az N- vagy C-terminálist nem tartalmazó konstrukciókkal transzfektált COS-7 sejtek vizsgálata arra is rávilágított, az NTPDáz1 molekulának melyik részlete vesz részt a kaveolákhoz történő kötődésben. A mutáns cDNS-ekkel transzfektált sejtekről először Western blot analízissel mutattuk ki, hogy a kívánt fehérjéket valóban kifejezik (42. ábra). Western blot analízist végeztünk a sejtek tápfolyadékából is, és itt találtuk meg az N-terminálisnál csonkolt molekulát, ami igazolta, hogy ez a forma szolubilis.



42. ábra Western blot analízis N- vagy C-terminálist nem tartalmazó konstrukciókkal transzfektált COS-7 sejteken. (A) A különböző CD39cDNS-ekkel transzfektált COS-7 sejteket 13 C-izotópot tartalmazó palmitinsavval inkubáltuk, majd autoradiográfiás vizsgálattal mutattuk ki az α -CD39 – CD39 komplexet (B)²⁰

A triciált palmitinsavval történő inkubálás utáni autoradiográfia jelzi, hogy a jelölt palmitinsavat csak a teljes CD39 cDNS-sel, ill. a C-terminálisnál módosított mutáns cDNS-sel transzfektált sejtek vették fel (42. ábra B). Enzimhisztokémiai kísérleteink ismét megerősítették, hogy a teljes CD39 cDNS-sel transzfektált sejteken kívül csak a C-

terminálisnál csokolt konstrukció eredményez a sejtekben ekto-ATPáz aktivitást. A kontroll COS-7 sejtek saját ekto-ATPáz aktivitása szinte elhanyagolható volt (43. A).

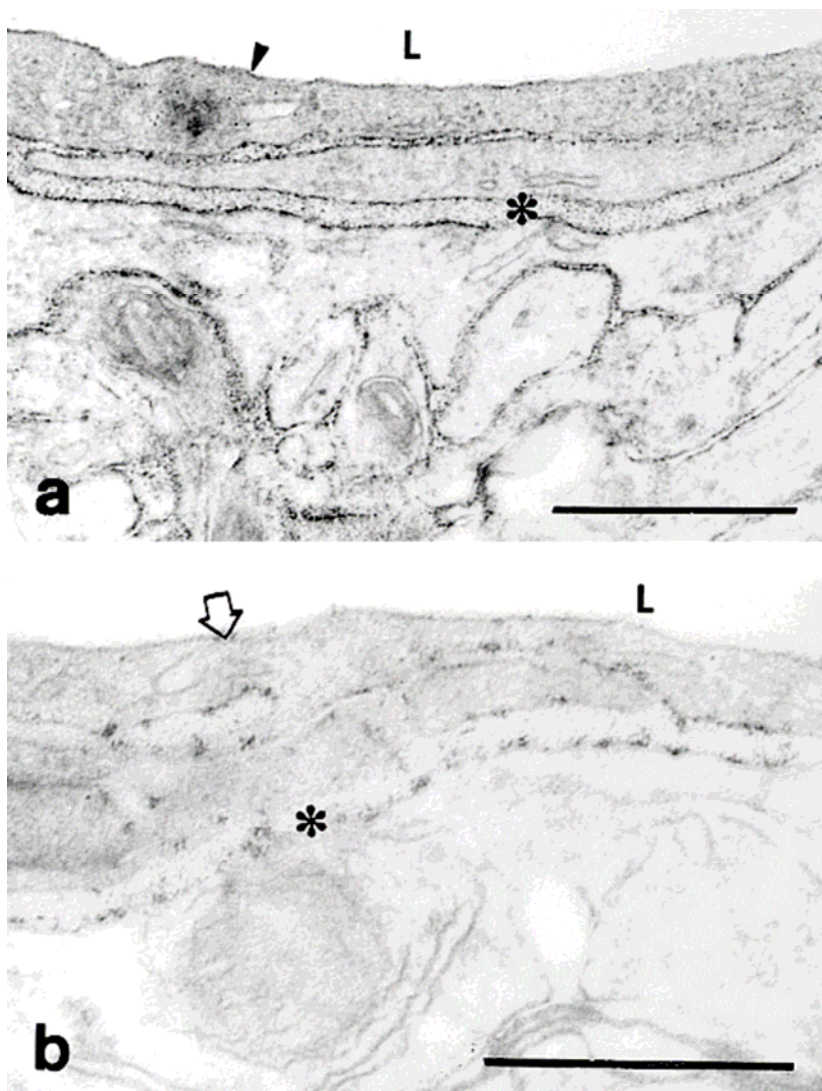


43. ábra Ekto-ATPáz kimutatás transzfektált COS-7 sejteken. A: pcDNS3 (üres vektor), B: pcDNS3-CD39, C: C-terminális csokolt pcDNS3-CD39, D: N-terminális csokolt pcDNS3-CD39²⁰. (Nagyítás: 45K, nyilak jelzik az enzimaktivitást mutató kaveolákat; *: extracelluláris tér)

Az eredmények igazolták, hogy valóban szoros kapcsolat van az NTPDázok közül legalább az NTPDáz1 és a kaveolák között és ez a kapcsolat az enzim poszttranszlációs módosulása, egy palmitinsav oldallánc kapcsolódása után jön létre, hasonlóan a kaveolákhoz kötődő más receptorok, enzimek esetéhez^{85,202}. Azt azonban, hogy mi minden befolyásolhatja az NTPDáz1 vagy legközelebbi rokonenzimjeinek megjelenését és aktivitását, milyen élettani-kórélettani szerepük lehet, még mindig nem tudtuk. A legfrissebb kutatási eredmények szerint az NTPDázok aktivitását nemcsak a kaveolákhoz, de a hozzájuk hasonlóan koleszterinben gazdag membránképletekhez, a membrántutajokhoz való kötődés is befolyásolja²⁰⁹. A szerzők kaveolin1 génhiányos egerek szövetén végzett kísérletekkel bizonyították, hogy legalább is az NTPDáz1 aktivitását elsősorban a membrán koleszterintartalma és nem a kaveolin1 jelenléte befolyásolja. Arról azonban, szükséges-e az NTPDázok poszttranszlációs módosulása ezen magas koleszterintartalmú membránkomponensekhez való kötődésben, még nincsenek adataink.

A kaveolákban gazdag endotél- és izomsejtek több szövetben, szervben is jó modellnek tűntek az NTPDáz és kaveolák közti kapcsolat vizsgálatára. A nagyobb erekkel – artériákkal kapcsolatos vizsgálatok esetében pedig egyszerre kaphattunk eredményt az endotélsejtekben és az erek falát körülvevő simaizomsejtekben lezajló változásokról.

Patkány agyi kapillárisok endotélsejtjeiben tanulmányoztuk, milyen hatása van a kétértékű kationoknak (Ca^{++} ill. Mg^{++}), ill. a pH változásának az ekto-ATPáz aktivitásra. Biokémiai mérések alapján valószínűnek tartották, hogy a sejtek membránján az ATPázoknak lehet valamilyen régiótól függő eloszlása^{210,211}, és pH-függésüket is feltételezték³⁰, de az enzimeket hisztokémiai módszerrel nem mutatták ki. Eredményeink bizonyították a régiótól függő eloszlást. A Mg^{2+} -függő ekto-ATPáz elsősorban a bazális oldalon aktív, míg a Ca^{2+} -függő ekto-ATPáz az endotélsejt mindkét oldalán jelen van (44. ábra). A pH változása – az enzim aktivitási maximuma pH 7.5 ill. 9.5 biokémiai adatok szerint – ezt az eloszlást nem befolyásolta.



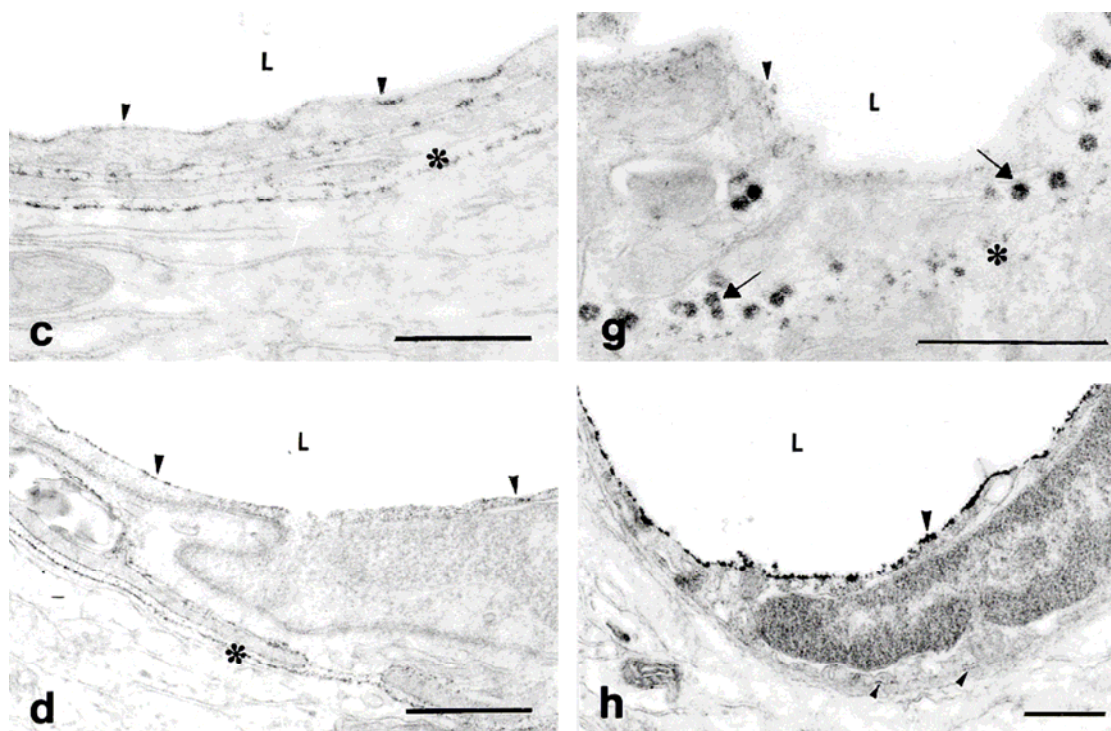
44. ábra Ekto-ATPáz aktivitás Ca^{++} (a) ill. Mg^{++} jelenlétében patkány agyi kapilláris endotélsejten (pH 7.5) ⁶ L: luminális oldal, skála: 0,5 μm

Egy bakteriális endotoxinnak, az LPS*-nek hatására azonban a kép megváltozott. Az LPS gyulladáskeltő hatását több sejttípuson, köztük endotélsejteken is kimutatták ²¹²⁻²¹⁶. Várható volt, hogy hatása lesz az ekto-ATPáz aktivitásra is, hiszen gyulladások,

* LPS: lipopolysaccharide

sérülések esetén a sejtekből igen nagy mennyiségű ATP áramolhat ki, és ennek gyors elbontása létfontosságú a környező sejtek működése szempontjából. Különösen igaz lehet ez a védekezésben kiemelt szerepű véragyagát alkotó endotélsejtek ektonukleotidáz aktivitása esetében.

Az LPS alkalmazott dózisa ($2\text{mg}/\text{testsúlykilogram}$) nem veszélyeztette az állat életét, de az ekto-ATPázok eloszlását pH-tól függő módon megváltoztatta (45. ábra).



45. ábra Agyi kapilláris endotélsejtek Ca^{++} - (c, g) ill. Mg^{++} -függő (d, h) ekto-ATPáz aktivitása LPS kezelés után pH 7.5 (c, d) és pH 9.5 (g, h) értékeknél ⁶ skála: $0,5\ \mu\text{m}$

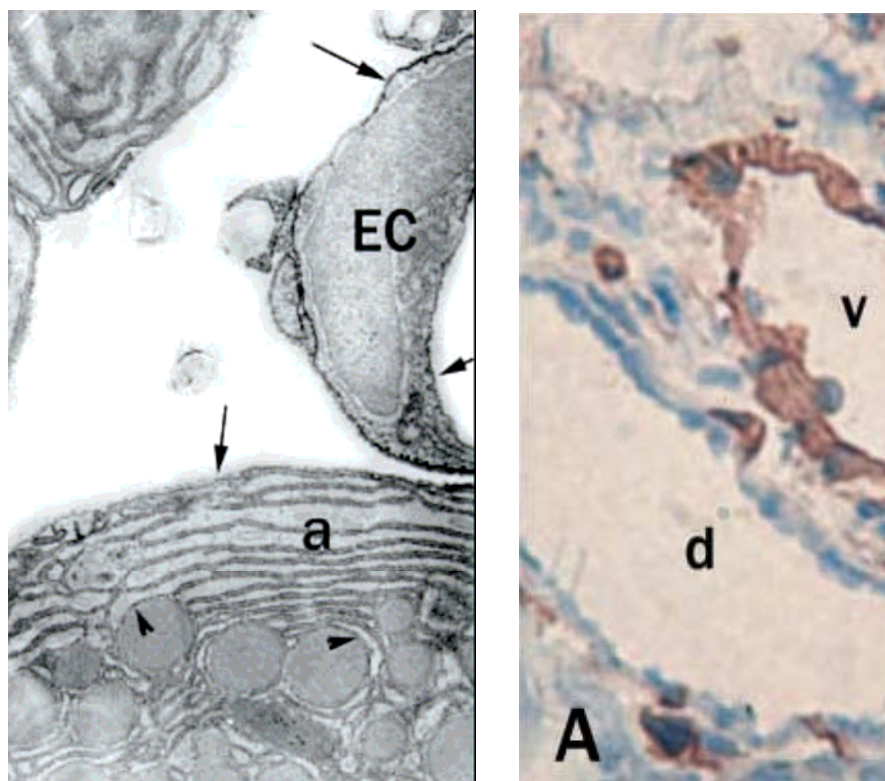
Nemcsak azt tapasztaltuk, hogy LPS hatására a Mg^{++} -ATPáz jelenlétére utaló csapadék megjelenik pH 7.5 mellett az endotélsejt luminális felszínén, de azt is megfigyeltük, hogy a pH emelkedése hatására (pH 9.5) ez az aktivitás válik dominánssá, a bazális oldalra addig jellemző enzimaktivitás szinte teljesen eltűnik. A Ca^{++} -ATPáz esetében, amely mindkét pH érték mellett az endotélsejtek mindkét oldalán jelen volt, morfológiai

változásra figyeltünk fel: nagyszámú kaveola jelent meg az endotélsejtek bazális oldalán, melyek Ca^{2+} -ekto-ATPáz-t tartalmaztak. Magyarázni még nem tudjuk, miért nem találtunk kaveolát a kapilláris endotélsejtekben akkor, amikor az inkubáló oldat csak Mg^{2+} -ot tartalmazott, s miért jelent meg az addig a sejt bazális oldalán megfigyelt Mg^{2+} -függő ekto-ATPáz aktivitás az LPS-kezelés után az endotélsejt apikális részén, de azt feltételezzük, hogy a megnövekedett ekto-ATPáz aktivitás egy, az LPS kezelésre kiváltott védekező reakció eredménye lehet. Ha stressz vagy sérülések hatására az élettaninál magasabbá válik a nukleotid és nukleozid koncentráció a sejtek közötti térben és a kapillárisok lumenében is, a megnövekedett ekto-ATPáz aktivitás az endotélsejtek luminális oldalán elősegítheti a gyors hidrolízist, míg a bazális oldalon, a nagyszámú kaveolában található Ca^{2+} -függő ekto-ATPáz részt vehet az endotélsejt és környezete közötti jelátviteli folyamatokban.

Amikor ezeket a kísérleteket végeztük (1997-98), még nem tudtuk az ATPáz aktivitással rendelkező enzimeket immunreakcióval azonosítani, az pedig még ma is vita tárgya, hogy az endotélsejtek két NTPDáz-t is kifejeznek-e ²¹, vagy az NTPDáz2 enzim csak az endotélsejtek támasztósejtjeiként is szolgáló periciták felszínén van jelen ²². Akkori eredményeink azonban arra utalnak, hogy legalább is a patkány agyi kapilláris endotélsejtek, melyek körül nem találunk pericitát, biztosan nem egy enzimet fejeznek ki és már akkor jelezték az enzim aktivitásváltozása és a kaveolák megjelenése közötti kapcsolat lehetőségét.

Az endotélsejtek azért olyan fontosak vizsgálatainkban, mert sok kaveolát tartalmaznak, és így kiváló alanyai az NTPDáz-kaveola kapcsolat tisztázásának. Azonban arról sem feledkezhetünk el, hogy ezek a sejtek, mint az ereket és a test belső üregeit bélelő sejtek, a szervezet összes szövetében előfordulnak, kiemelt szerepük van a vér homeosztázisának fenntartásában, és sok patológiás folyamat első célpontjai, ezért vizsgálatuk több szempontból is hasznos lehet. Különösen azoknak a szöveteknek az esetében igaz ez, ahol már bizonyított a purinerg szabályozás, mint pl. a hasnyálmirigy.

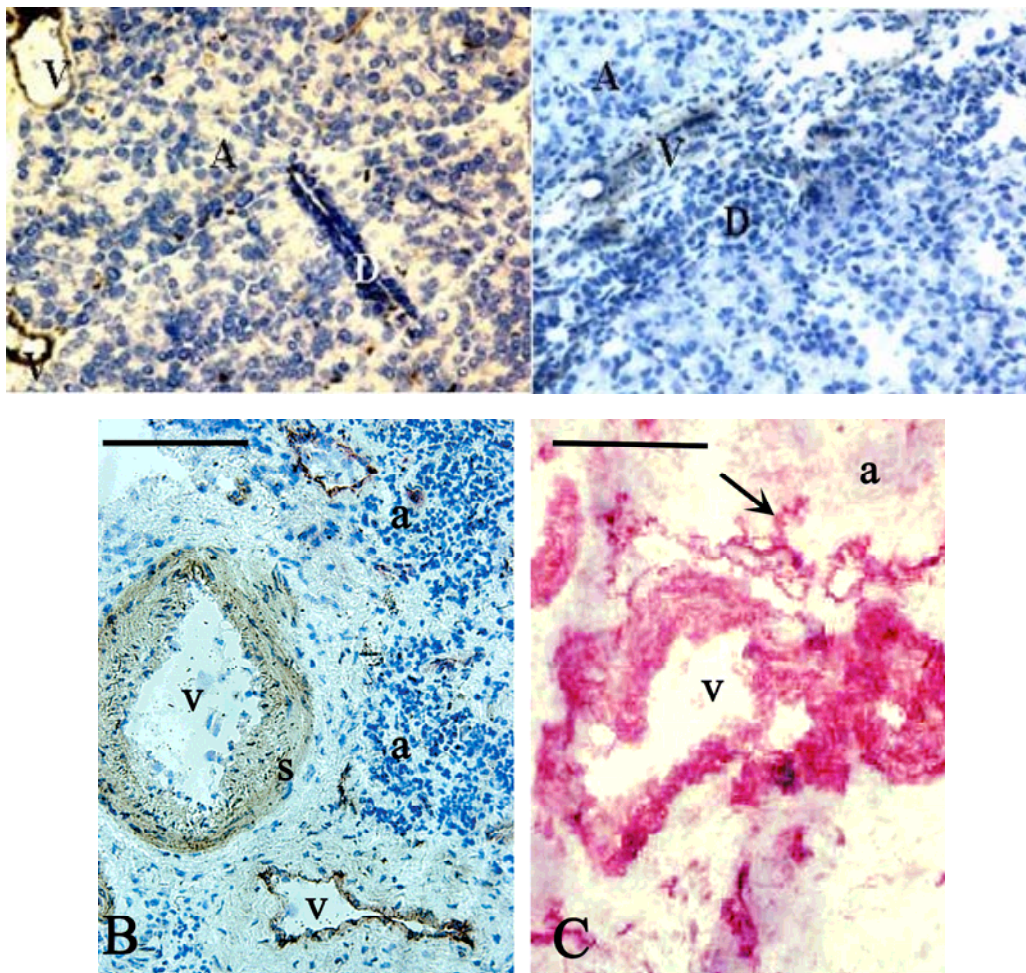
Egér hasnyálmirigy endotélsejtjeinek sejtmembránján mindig kimutatható volt az ekto-ATPáz aktivitás (46. ábra, bal oldal), és ezt az aktivitást immunreakcióval mint az NTPDáz1-ből származót azonosítottuk 46. ábra jobb oldal).



46. ábra Ekto-ATPáz aktivitás egér hasnyálmirigy elektronmikroszkópos metszetén (EC: endotélsejt, a: acinus, a nyilak: csapadék a sejtmembránokon ill. kaveolákban (EC lumen felőli oldal, ill. az acinusokban a granulumok membránjában). Jobb oldal: **Immunreakció (ABC-DAB) kriosztátos metszeten. Az endotélsejtek membránja erősen, az acinusok gyengébben festődtek, míg a duktusz epitélsejtek egyáltalán nem mutattak immunreaktivitást NTPDáz1-re**²¹ (v: ér, a: acinus)

Patkány, tengerimalac és emberi hasnyálmirigyszövetekben egyaránt azt találtuk, hogy az endotélsejtek ekto-ATPáz aktivitása jelentős, eltérés mutatkozik viszont az

acinusokon található aktivitásban. A duktuszok és acinusok egyedül a patkány hasnyálmirigyszövete metszetein jeleztek aktív ekto-ATPáz enzimet (47. ábra).

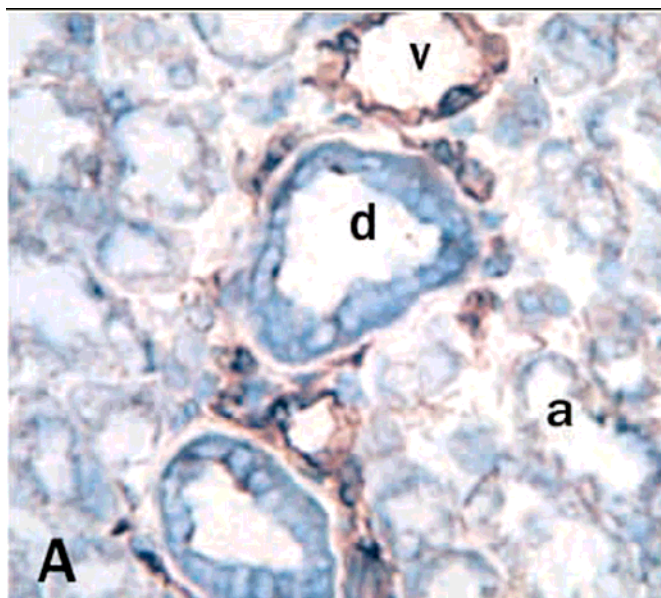


47. ábra *Felső sor:* Patkány hasnyálmirigyszövetén az ólomszulfid (barna csapadék) mutatja az endotélsejtek (V), acinusok (A) és duktuszsejtek (D) ekto-ATPáz aktivitását. A mellette levő tengerimalac hasnyálmirigyszövet metszetén csak az endotélsejtek jelölődtek ¹⁷⁴.

B, C : Egészséges emberi hasnyálmirigyszövet ¹⁷³. B: az enzimhisztokémiai reakció barna színe jelzi az erek (v) endotél-és simaizomsejtjeinek ekto-ATPáz aktivitását. Az eloszlás megegyezik az NTPDáz1-re alkalmazott immunfestés eredményével (C, alkalikus foszfatáz-Fast Red reakció). Az acinusok (a) egyik esetben sem jelölődtek.

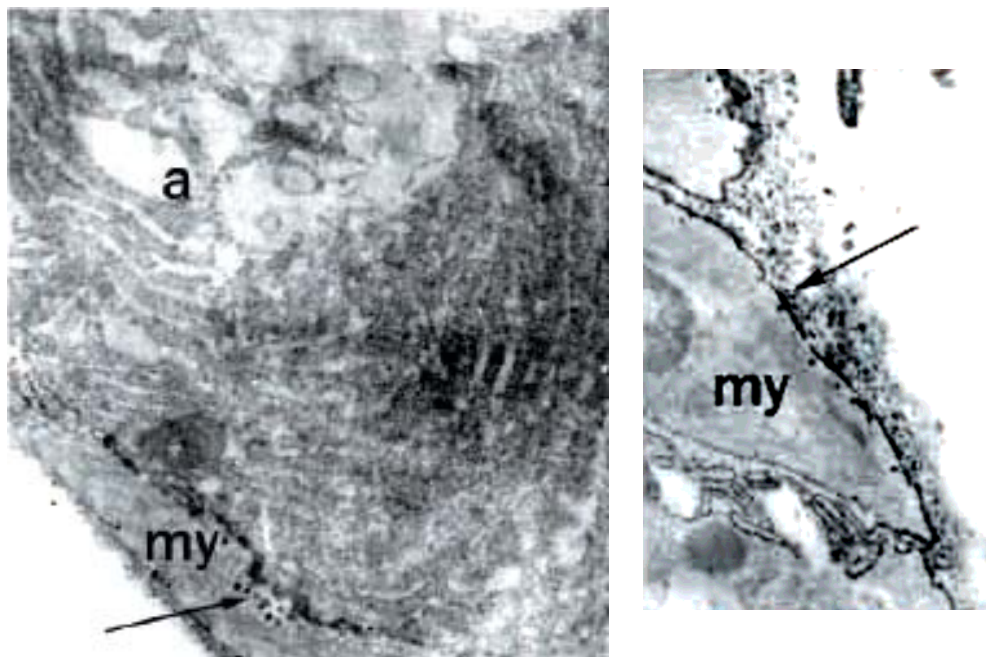
Fagyasztott metszetek, haematoxinin háttérfestés. skála: 60 µm

Egérben a gasztrointesztinális rendszer egy másik tagját, a szubmandibuláris nyálmirigyet is megvizsgáltuk, és az endotélsejtek esetében hasonló eredményt kaptunk (48. ábra).



48. ábra NTPDáz1 immunfestés egér szubmandibuláris nyálmirigyszövet fagyasztott metszetén. Az erek endotélsejtjei (v) erősen, a mukózus acinusok (a) gyengén festődnek, míg az intralobuláris csatornák epitélsejtjei (d) nem mutatnak immunreaktivitást ²¹

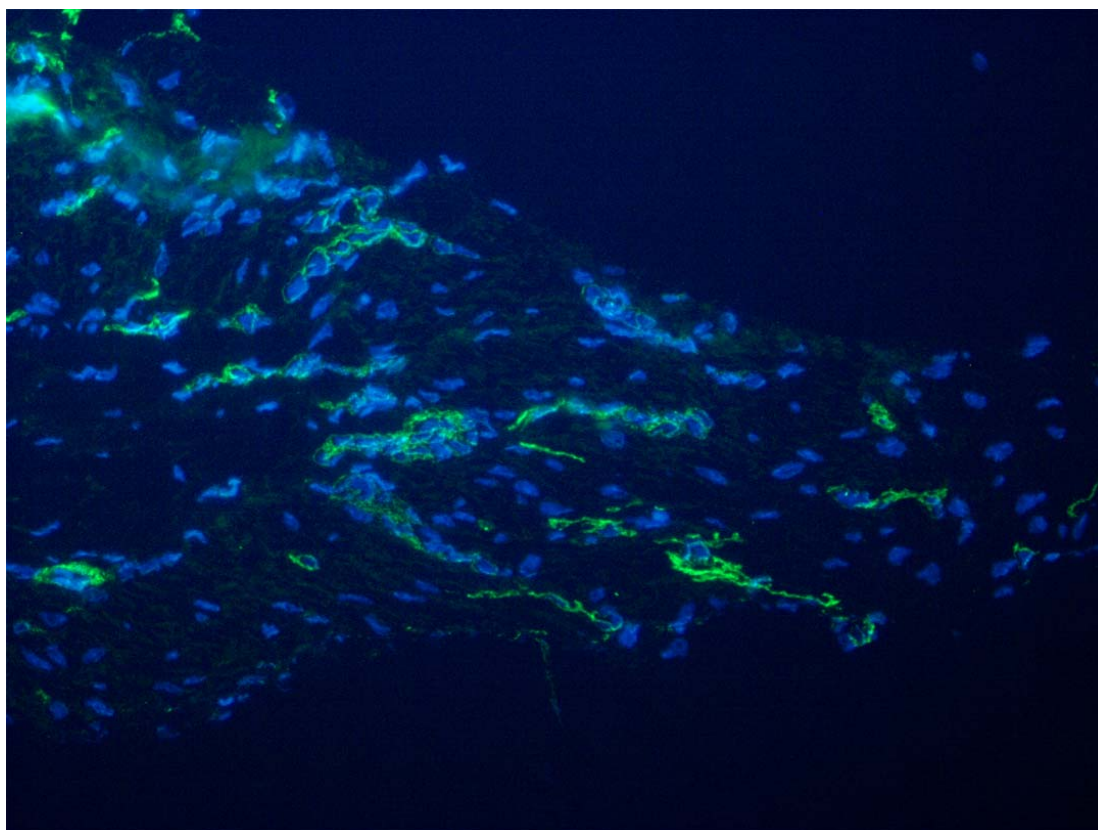
Ebben a szövetben azonban nemcsak az endotélsejtekben találunk bőséggel kaveolákat, de az acinusok mellett található ún. mioepitélsejtekben is. Enzim- és immunhisztokémiai vizsgálatokkal bizonyítottuk, hogy a mioepitélsejtek kaveolái NTPDáz1 enzimet tartalmaznak aktív állapotban, míg az NTPDáz1 génkiütött állat szövetén végzett enzimhisztokémiai reakció azt is igazolta, hogy az NTPDáz1-en kívül más ATP szubsztrátú ektoenzim is jelen van itt ²¹ (49. ábra).



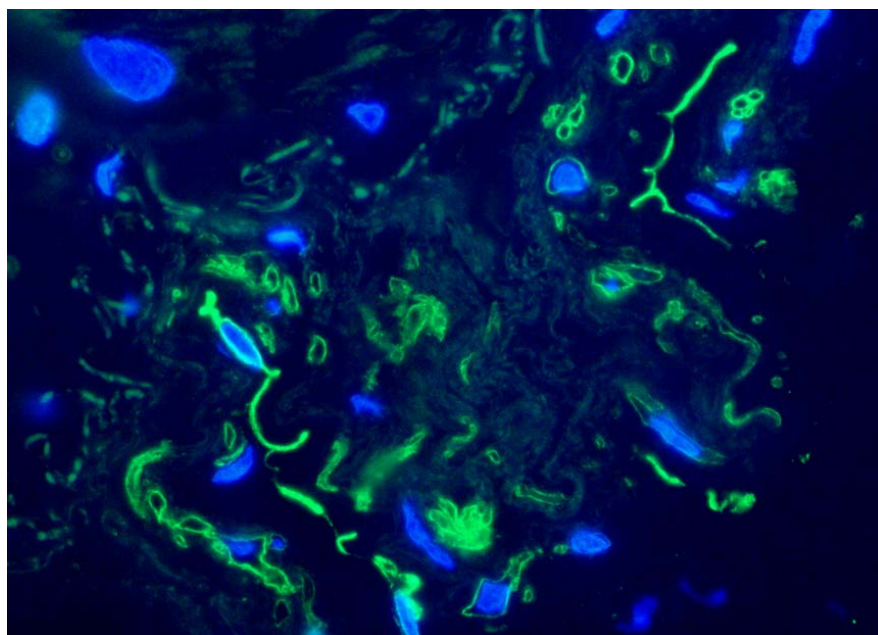
49. ábra NTPDáz1 immunfestés egér szubmandibuláris nyálmirigyszöveten. A mioepitélsejt (my) és az acinussejt (a) bazális membránja egyaránt immunreaktivitást mutat. A mioepitélsejtben jól láthatók az erősen festődött kaveolák (nyíl). Jobb oldalon: Enzimhisztokémiai festés NTPDáz1 génkiütött egér szövetén. Az acinusok és a mioepitélsejtek membránja is tartalmazza az aktív enzimet jelző cériumfoszfát csapadékot, mely a kaveolákban is megtalálható ²¹.

Ezeknek az eredményeknek alapján úgy tűnik, legalább is az endotélsejtekben, az NTPDáz1 expressziója a vizsgált fajokban rendkívül hasonló, ezt még a szövetben lezajló tumoros elváltozások sem befolyásolják. Mivel azonban az LPS-sel kiváltott gyulladásos folyamat után láttunk változást a kaveolák–ekto-ATPáz kapcsolatban, ráadásul pont endotélsejtekben, feltételeztük, hogy ez a kapcsolat nem ennyire egyértelmű.

Bypass műtétből származó emberi szívizomszövetet vizsgáltunk, ahol endotél-szívizom- és simaizomsejtek is tartalmaznak kaveolákat. Egészséges és betegminták ultrakriosztátos metszetein végeztünk immunfestést NTPDáz1 fehérjére. Az ultrakriosztátos metszetek felbontása nem mérhető az elektronmikroszkópos képek felbontásához, de a kaveolák csoportjai már itt felismerhetők. Megállapíthattuk, hogy egészséges mintákban NTPDáz1 fehérjét csak az endotél- és simaizomsejtek tartalmaznak (50. ábra). A betegminták esetében azonban festődést találtunk a szívizomsejtek belsejében is, vagyis nem a sejtmembránhoz kötötten, és azonosítatlan, minden bizonnyal kötőszöveti eredetű sejtek membránjában is (51. ábra)²¹⁷.

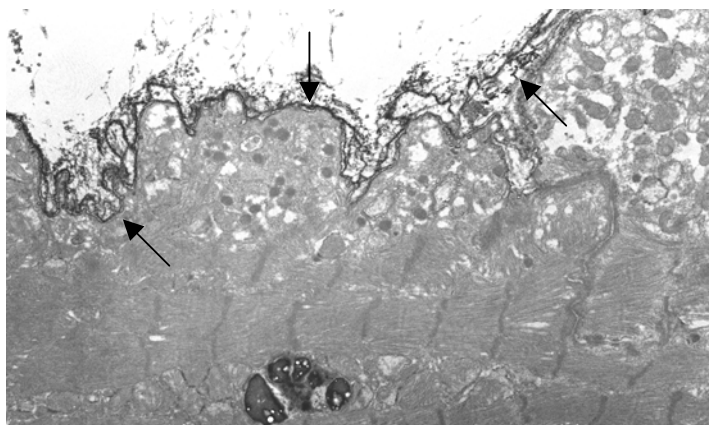


50. ábra Egészséges emberi szívsvövet 300 nm vastag fagyasztott metszetén végzett NTPDáz1 immunfluoreszcens festés. A zöld szín jelzi (*Alexa 488*) az erek endotél- és simaizomsejtjeinek immunreaktivitását. A szívizomsejtek sejtmagját DAPI festés jelöli²¹⁷.



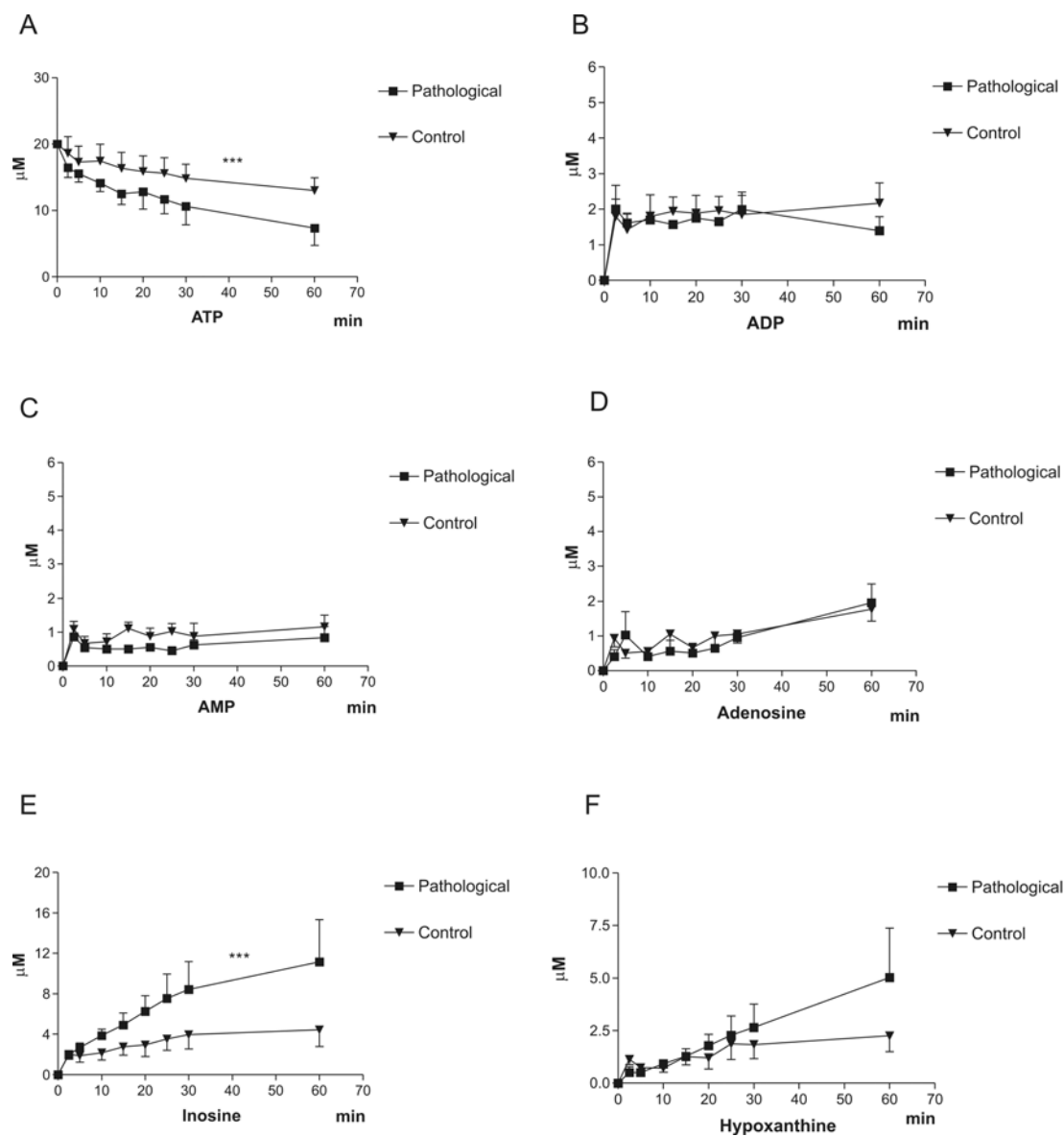
51. ábra NTPDáz1 immunfluoreszcens festés. A zöld szín (Alexa 488) az erek endotél- és simaizomsejtjeiken kívül a szívizomsejtek belsejében és más sejtek membránjában is immunreaktivitást mutat. Sejtmagfestés: DAPI. Emberi szívszövet 300 nm vastag fagyasztott metszete – beteganyag²¹⁷.

A szívizomsejtek ekto-ATPáz aktivitását enzimhisztokémiai reakcióval is kimutattuk (52. ábra).



52. ábra Emberi szívizomsejtek ekto-ATPáz aktivitása (patológias szövet)²¹⁷

Az egészséges és betegminták ekto-ATPáz aktivitásának különbségét érzéketesen ábrázolják a HPLC-UV technikával kapott eredmények (53. ábra)²¹⁷.



53. ábra Az ATP és származékainak mérése HPLC-vel. A görbék hat külön kísérlet átlagát mutatják²¹⁷. A csillaggal jelzett görbénél az egészséges és betegminták között a két utas ANOVA teszt szignifikáns ($p < 0.01$) különbséget mutatott.

Az ATP mennyisége csökkent az idő előre haladtával, míg a hidrolízis termékeké nőtt. Megfigyelhető és mérhető volt, hogy a betegminták esetében az ATP hidrolízise lényegesen gyorsabb, mint az egészséges szöveteknél, és a hidrolízis termékek közt csak az inozin koncentrációjában (mely a kiindulási ATP-koncentrációnak 40 %-át sosem haladta meg) van jelentős különbség.

A szövetek NTPDáz1 tartalmát Western blottal is ellenőriztük (54. ábra)²¹⁷.

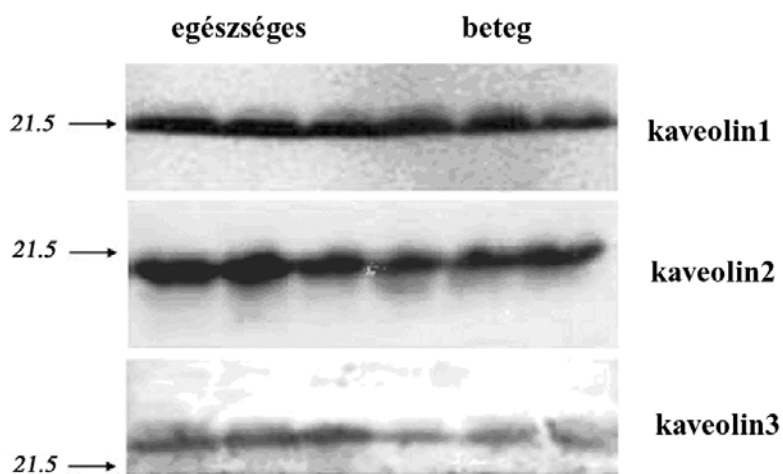


54. ábra Western blot analízis NTPDáz1-re emberi szívizomban²¹⁷. (3-3 egészséges és betegminta)

A változás ha nem is érte el a statisztikailag szignifikáns szintet, de jelezte, a betegmintákban az NTPDáz1 nagyobb mennyiségben található.

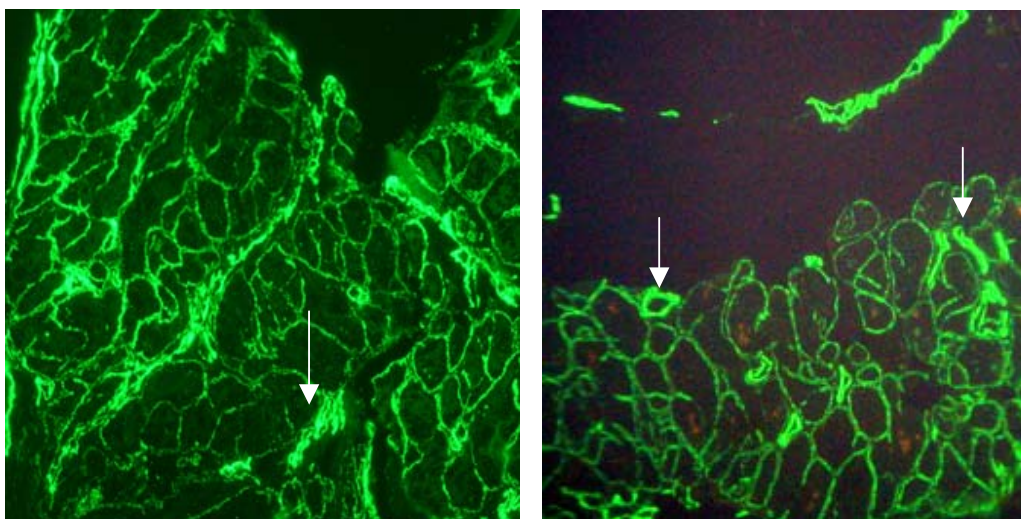
Ez a koncentráció növekedési tendencia alátámasztotta azt, amit különösen a kardiovaszkuláris rendszer kapcsán már többször is leírtak, hogy az NTPDáz1-nek minden bizonnyal jelentős szerepe van a szervezet gyulladások, stressz, sérülések elleni védekezési folyamataiban.

A kaveolinfelhérjékre is elvégeztük a Western blot analízist, amely csak az izomsejtekre specifikus kaveolin3 esetében mutatott a szignifikanciaszintet ($p < 0.05$) elérő eltérést. Expressziója a betegmintákban csökkent (55. ábra). A kaveolin1 esetében azonban nem találtunk változásra utaló jelet. Mintha ez a legismertebb, legáltalánosabban előforduló kaveolinfelhérje ellenállna olyan hatásoknak, amelyekre a vele szerkezetileg rokon kaveolin3 már érzékeny.



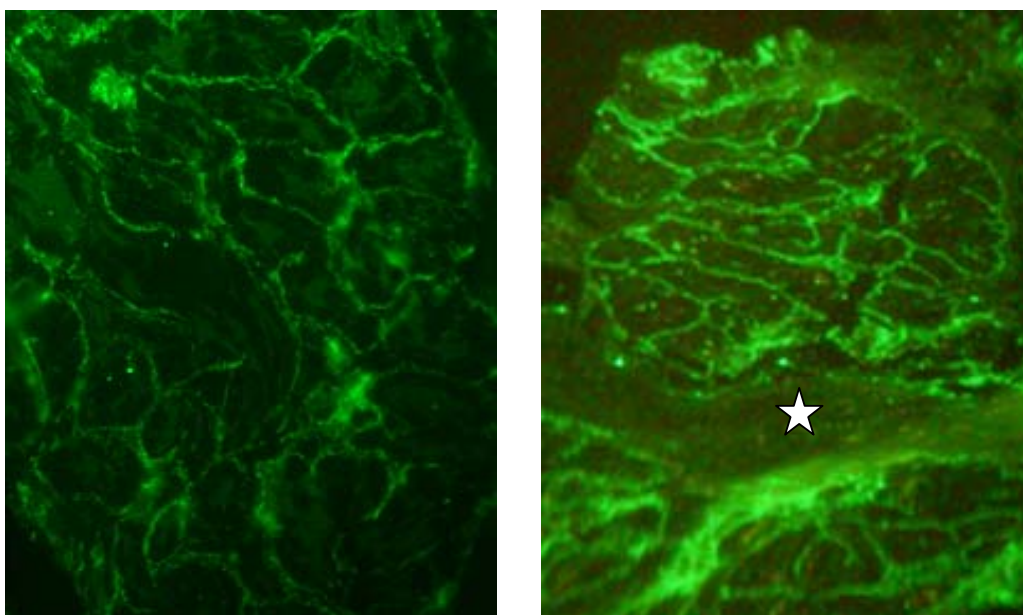
55. ábra Western blot analízis kaveolinhérjékre emberi szívizom mintákban ²¹⁷
(három-három egészséges és betegminta)

Elvégeztük az immunfluoreszcens festéseket is. Kaveolin1-re ismét meglepő eredményt kaptunk: az endotél- és simaizomsejtek mellett a szívizomsejtek is erőteljes immunreaktivitást mutattak (56. ábra). Kaveolin1-et szívizomsejtben eddig még senkinek nem sikerült kimutatnia.



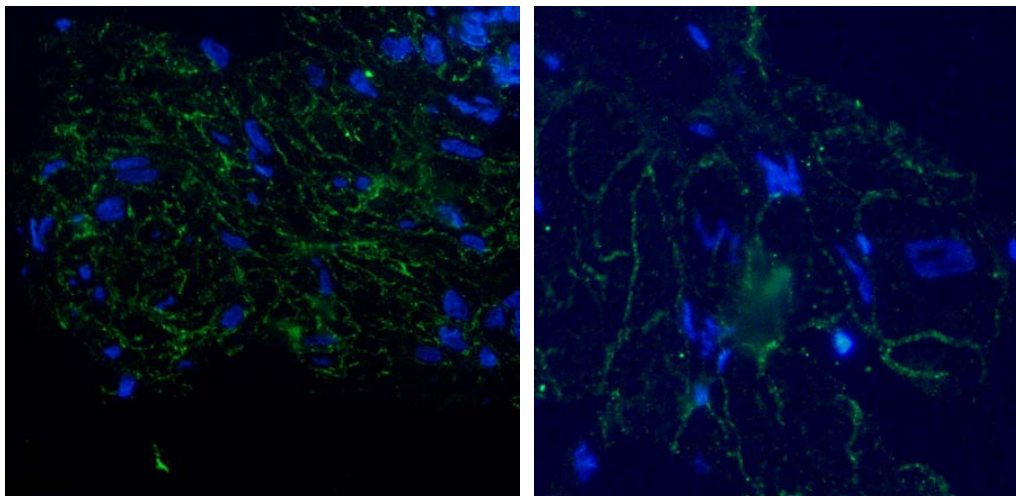
56. ábra Immunfluoreszcens festés kaveolin1-re emberi szívizom 300 nm-es fagyasztott metszetén. A jelölődés az egészséges és betegmintában azonos, a nyilak az ereket mutatják ²¹⁷

A kaveolin2, mely mind a kaveolin1 mind a kaveolin3 mellett előfordulhat, jelen volt a szövetminta minden sejtípusában. A kaveolin1-nél jóval kisebb mennyiségét a festődés jóval gyengébb festés intenzitása is mutatta (57. ábra).



57. ábra Immunfluoreszcens festés kaveolin2-re emberi szívizom 300 nm-es fagyasztott metszetén. A jelölődés az egészséges és betegmintában azonos, a szívizomsejtek csoportjait a betegmintában (jobb oldal) kötőszövetes „sövények” választják el (*)²¹⁷

A kaveolin3 festés igazolta a Western blot eredményét. Az egészséges mintában is gyenge festődés szinte láthatatlanná volt a betegmintában. Az eredmény valóságát igazolja, hogy míg a kaveolin1-et megtaláltuk a szívizomszövet gyakorlatilag minden tipikus sejtjében (*endotél, simaizom, szívizomsejtek*), és ezt elmondhatjuk a kaveolin2-re is, addig a kaveolin3 kizárólagosan az izomsejtekben volt fellelhető (58. ábra).



58. ábra Immunfluoreszcens festés kaveolin3-ra emberi szívizom 300 nm-es fagyasztott metszetén ²¹⁷

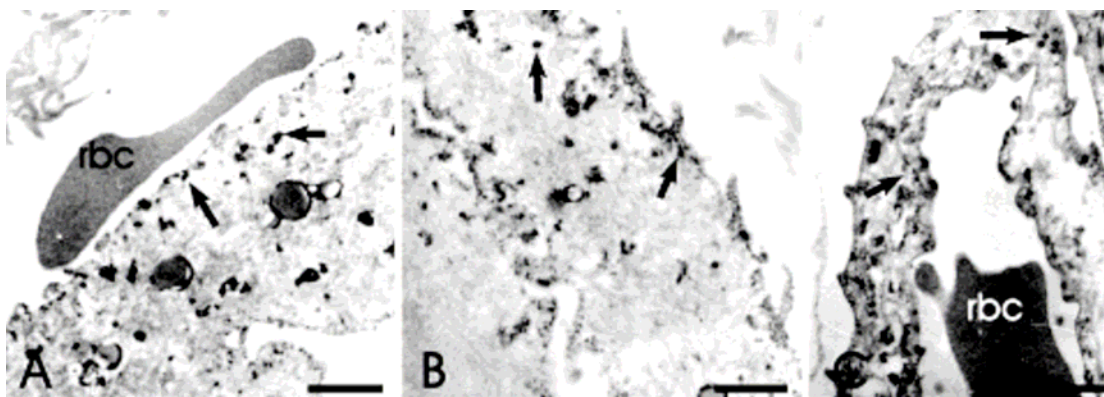
Az NTPDázok és kaveolinok kapcsolata még távolról sem ismert és a jövőben is számíthatunk arra, hogy meglepő eredmények születnek

Mai eredményeink tanúsága szerint a kaveolák megjelenése az ekto-ATPáz aktivitás növekedésével járhat, másrészt az ekto-ATPáz aktivitásának növekedéséhez úgy tűnik, nincs feltétlenül szükség a kaveolinok fokozott expressziójára, sőt, ez a kaveolinok expressziójának csökkenése mellett is megtörténhet.

A kapcsolatot tovább bonyolíthatja, ha az NTPDázakkal a közös szubsztrátért vetélkedő purinoceptorok szintén kapcsolódhatnak a kaveolinokhoz. Eddig ezt a lehetőséget csak saját kísérleti eredményünk bizonyítja.

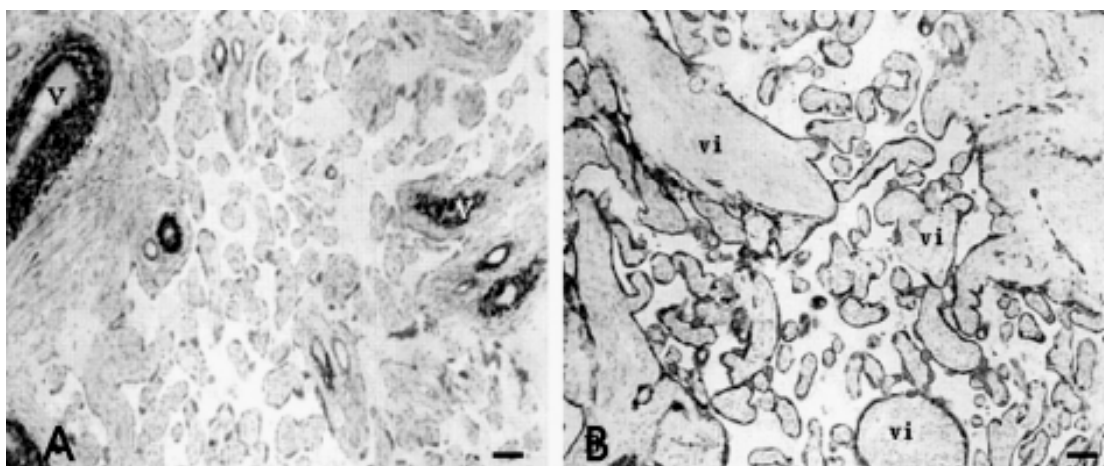
Tíz hetes magzati és érett (9 hónapos) emberi méhlepényből készült ultraktriosztátos metszeteken (70 nm) vizsgáltuk a kaveolin1 és NTPDáz1 eloszlását, és két purinoceptorra is elvégeztük a jelölést, a P2Y1-re és a P2Y2-re. Az NTPDáz1 mellett a P2Y1 receptor jelenlétét is sikerült kimutatni a méhlepény endotélsejtjeiben és ezen belül is a kaveolákban ¹⁹ (59. ábra). Ez még nem elég bizonyíték az NTPDáz1 és a P2Y1 receptor kapcsolatára, de az azonos szubsztrátért való versengés elméletileg létrejöhet, hiszen a két fehérje igen kis távolságban kell legyen egymástól a mindössze 50-100 nm átmérőjű kaveolában. Megfigyeltük azt is, hogy az idő, a szövet érettségének

előrehaladtával a kaveolák mérete és elhelyezkedése is változott. Valószínűsíthető, hogy az érési folyamat a kaveolához kötődő receptorok, különböző fehérjék számát is befolyásolja.



59. ábra 10 hetes emberi méhlepényben kaveolin1 (A, nyíllal jelezve), P2Y1 (B, nyíllal jelezve) és NTPDáz1 (C, nyíllal jelezve, rbc: vörösvértest) festődés az endotélsejt kaveoláiban ¹⁹ skála: 0,5 μm

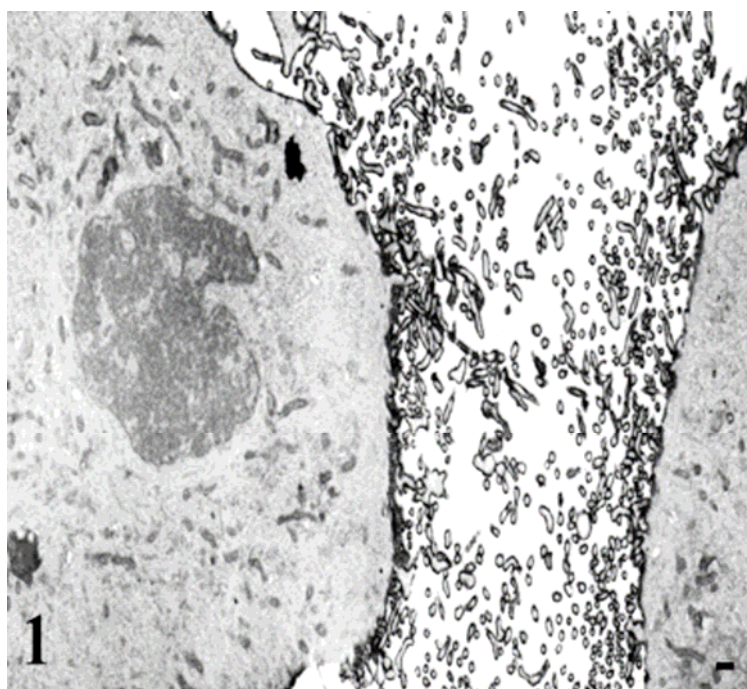
Fénymikroszkópos vizsgálatra készült fagyasztott metszeteken végzett fetések is azt mutatják, a P2Y1 receptor a placentában csak az endotéliumban található, míg a P2Y2 receptor a syncytiotrophoblast sejtek membránjában jelenik meg (60. ábra).



60. ábra P2Y1 receptor (A) és P2Y2 receptor (B) előfordulása érett emberi méhlepényben (v: erek, vi: villusok – DAB festés) ¹⁹ skála: 15 μm

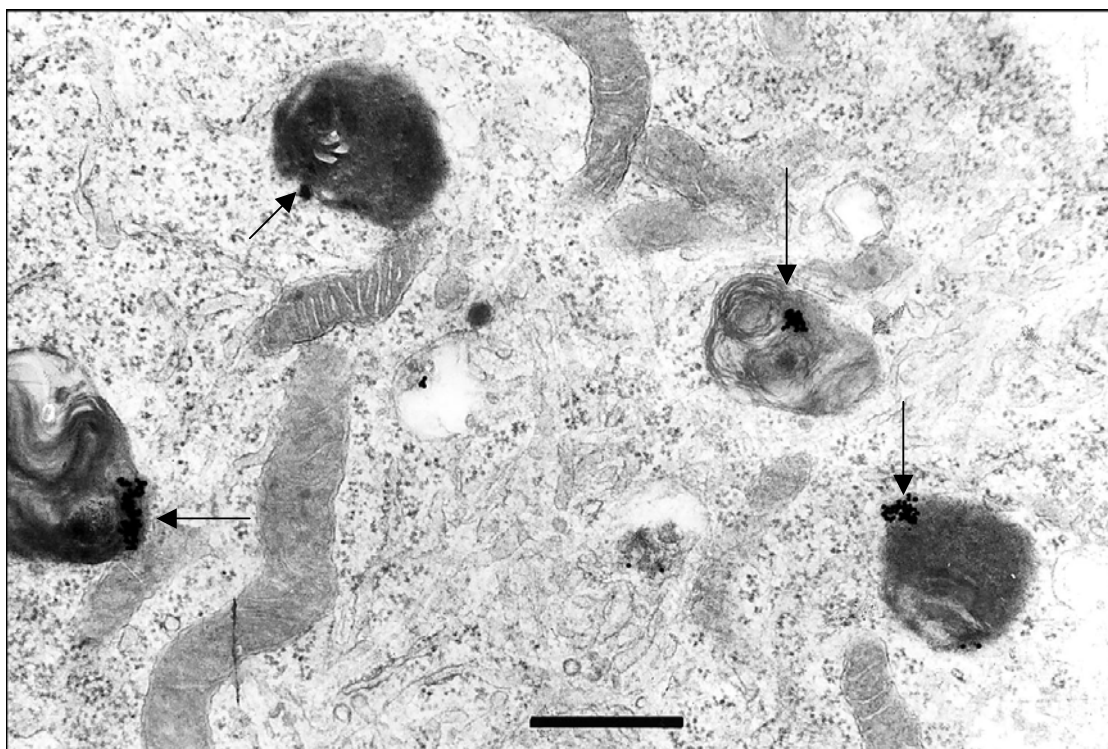
Ez a kísérlet tehát egy újabb lépés azon az úton, mely remélhetőleg a purinerg szabályozás megismeréséhez vezet. Az eredmény öröndetes, hiszen elsőként azonosítottunk egy purinoceptort a kaveolában, de még mindig nem tudunk válaszolni arra a kérdésre, az endotélsejteken, részben izomsejteken kapott eredmények általánosíthatók-e, érvényesek-e más kaveolát tartalmazó sejtekre is? Igaz-e, hogy ha valami kiváltja a kaveolák megjelenését, akkor az ekto-ATPáz aktivitás is megnövekszik?

Asztrocita tenyészeteten kapott eredményeink mindenesetre ilyesmire utalnak. Asztrocita tenyészetet azért vizsgáltunk, mert az irodalomban leírt és saját idegszöveten kapott eredményeink szerint is, gliasejtek is kifejezhetnek NTPDáz enzimeket. Mivel az ATP-nek nemcsak szinaptikus folyamatokban lehet kiemelt szerepe, de a nemszinaptikus ingerületátvitelben is, így az idegsejtekkel szoros kölcsönhatásban lévő asztrociták egyre inkább az érdeklődés középpontjába kerülnek ^{218,219}. Az asztrocitatenyészeteten elvégzett enzimhisztokémiai reakció a sejtek erőteljes ekto-ATPáz aktivitását mutatta (61. ábra).



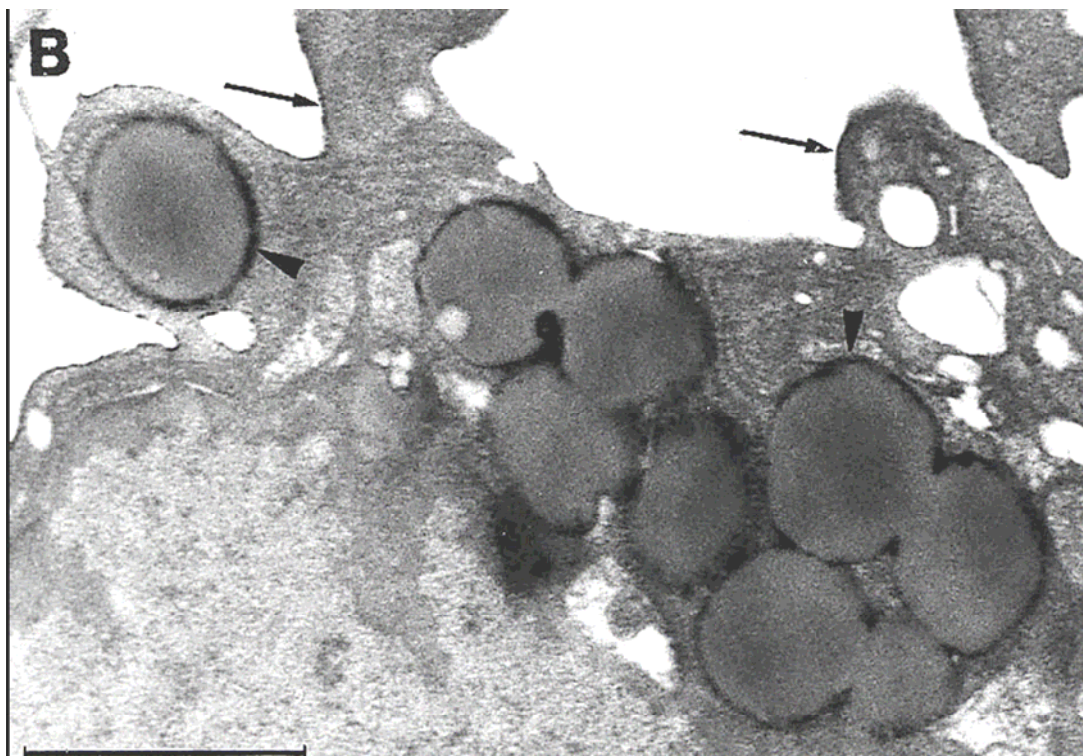
61. ábra Asztrocitasejtek és nyúlványaik ekto-ATPáz aktivitását mutatja a felszínüket borító Ce-foszfát csapadék ¹¹⁷ skála: 300 nm

A tenyészetet a már ismertetett LPS-sel kezeltük és ennek több következménye is lett. Az egyik, hogy megnőtt a sejtek fagocitotikus aktivitása. Ezt két módon is ellenőriztük, a 62. ábrán az ún. „aranyetetéses” módszer eredménye látható. Az asztrocitasejtekben megnőtt a lizoszómák száma és azok vették fel a sejtek tápoldatához adott 15 nm átmérőjű arany szemcséket (62. ábra).



62. ábra LPS-kezelt asztrocitasejt tenyészetben. Az endolizoszomális vezikulák arany szemcse csoportokat tartalmaznak ¹¹⁸ (nyilak). skála: 300 nm

Ha ugyanezen kezelés után nem aranyetetés, de ekto-ATPáz kimutatása következett, szintén megfigyelhettük a lizoszómák megnövekedett számát, de azt is, hogy az enzimaktivitást jelző csapadék a lizoszómák membránjában is megtalálható volt, valószínűleg ugyancsak az LPS hatására megnövekedett fagocitotikus tevékenység eredményeképpen (63. ábra).

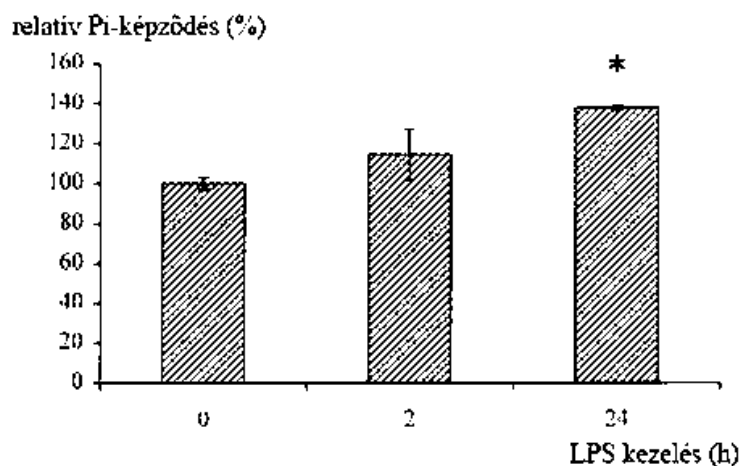


63. ábra Enzimaktivitást jelző Ce-foszfát csapadék asztrocitasejt membránján és lizoszómáinak membránján ¹¹⁸ (nyíl, nyílhegy) skála: 300 nm

PMA*-kezelés után ugyan megfigyeltek már hasonló jelenséget emberi neutrofil granulocitasejtekben ²²⁰, de korántsem biztos, hogy egyszerű endocitózisról van szó. Endocitózis során a membrán minden komponense valamilyen lebomlási utat követve újra felhasználásra kerül, de az asztrocitákban található vezikulák alakja és nagysága nem hasonlít az endocitotikus vezikulákéhoz. Feltételezhetnénk azt is, hogy a jelátvitel szabályozásának egyik módjáról van szó, a csapadékszemcséket tartalmazó vezikulák a sejtben frissen képződött enzimet szállítanak a felszínre – de ez az ekto-ATPázokról szerzett eddigi ismereteinknek mondana ellen. Akármelyik folyamatról legyen is szó azonban, mindkettőhöz energia szükséges, amit az ekto-ATPáz működése során

* PMA: phorbol myristate acetate

felszabaduló energia fedezhet. Az LPS kezelés hatására megnövekedő ekto-ATPáz aktivitást fotometriás méréssel is igazoltuk (64. ábra).

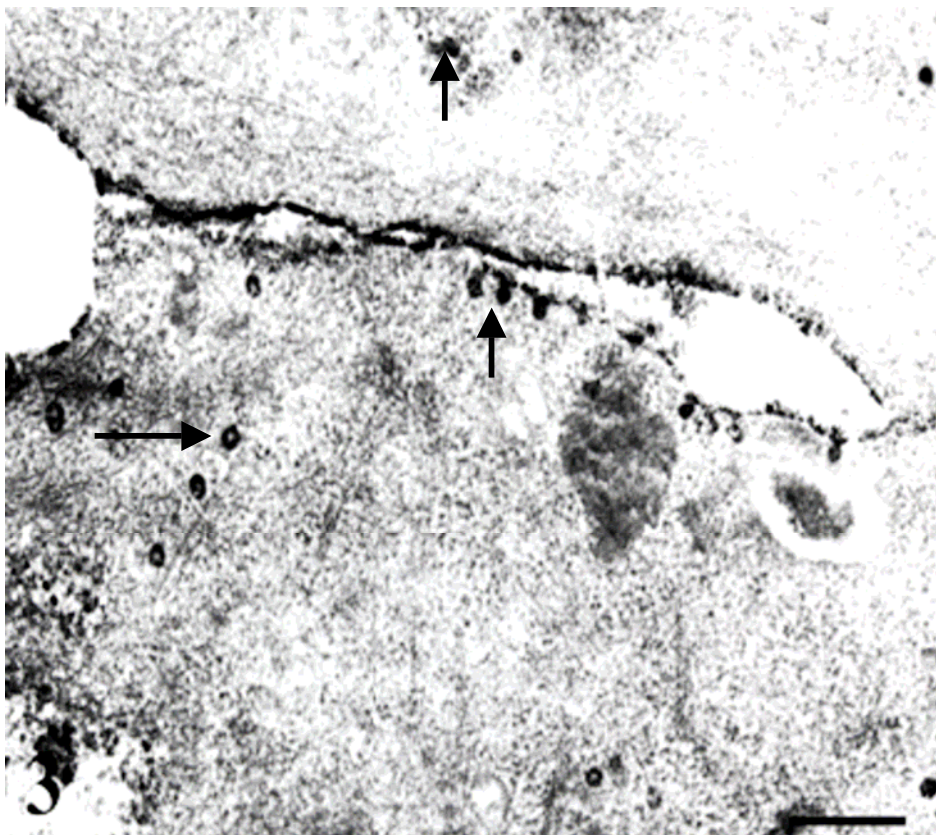


64. ábra LPS kezelés hatása asztrocitatenyészet ekto-ATPáz aktivitására. A mért szervesen foszfáttartalom értékek a kezeltetlen tenyészetben mért értékekre vonatkoztatottak (100 % = $1.87 \pm 0.07 \mu\text{M Pi/tenyészet}$)¹¹⁸. (4-6 mérésből számolt átlag+SD. *: $P < 0.05$)

Az LPS alkalmazásával végzett, gyulladásos folyamatot „modellező” kísérleteink megmutatták, hogy az ekto-ATPázoknak, legalább is e folyamatok kezdeti szakaszában, valamilyen védő szerepe lehet azzal, hogy nagyobb mennyiségben képződve képesek a nagyobb koncentrációban megjelenő ektonukleotidok elbontani.

A kísérletnek még egy meglepő felfedezése is volt. Egyes asztrocitákban kaveolák is megjelentek, és ezek a kaveolák szintén ekto-ATPáz aktivitást mutattak (65. ábra).

Ez a kaveolához kötődő enzim valószínűleg itt is az NTPDáz1, ami részt vehet a sejtek közötti purinerg jelátvitel modulálásában is.



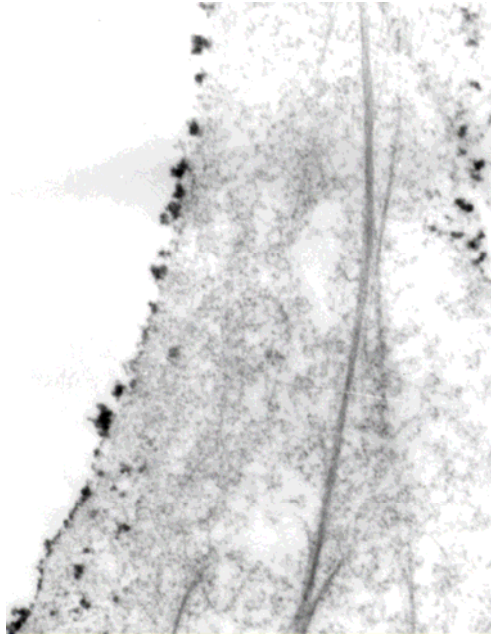
65. ábra LSP kezelés hatására képződött kaveolák egy asztrocita sejtben, sejttenyészetben ¹¹⁷. A sejt belsejében látható vezikulákban ill. mint membránbefűződés megjelenő kaveolákban ekto-ATPáz aktivitásra utaló csapadék (nyilak) skála: 300 nm

Az, hogy az asztrociták tartalmazhatnak kaveolákat, akkor (1999) még egyáltalán nem volt általánosan elfogadott, többen műterméknek gondolták. Ma, amikor a kaveolinoknak már az idegrendszerben is fontos szerepet tulajdonítunk, sem hisszük, hogy a kaveolinok előfordulása egyben azt is jelenti, a kaveolák klasszikus formájú megjelenésével kell számolnunk az idegrendszer sejtjein. Amikor kaveoláról és nem csupán kaveolinokról beszélnek, az is leginkább az ún. "lapos" kaveolákat jelenti ²²¹⁻²²⁵. Asztrocita sejttenyészetben végzett *in vitro* kísérletünk nyilvánvalóvá tette, nemcsak endotélsejtek, gliasejtek is képesek a klasszikus formájú kaveolák megjelenítésére és az is kétségtelen, hogy ezek működő kaveolák, hiszen bennük ugyanúgy megtalálható az

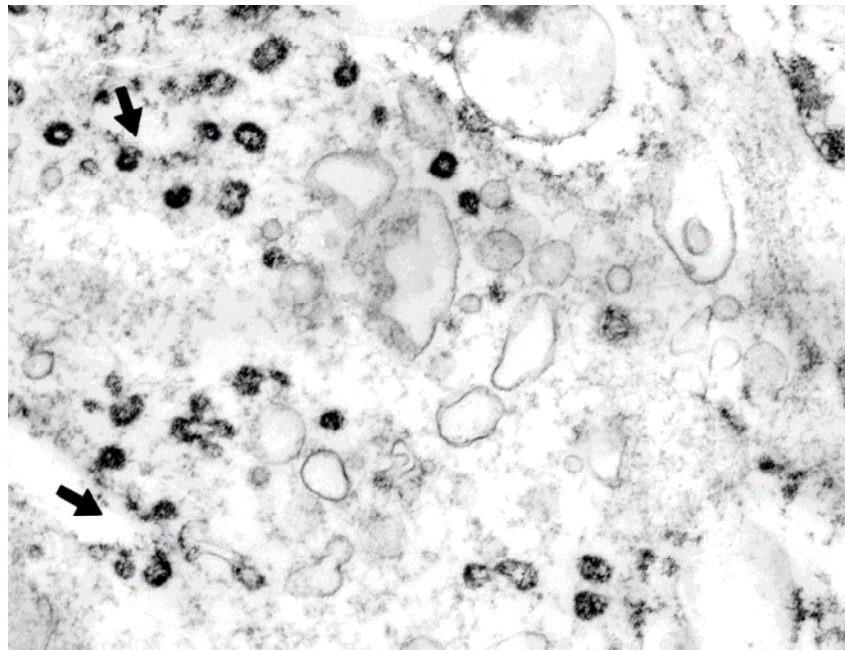
aktív ektonukleotidáz enzim, mint a simaizomsejtekben vagy endotélsejtekben. Nem feledkezhetünk el arról, hogy a kaveolák nagyobb számban való megjelenése egy endotoxin hatására történt, ahogy agyi kapilláris endotélsejtek esetében is. Ez azt jelentheti, hogy más patológias folyamatok, gyulladások ugyancsak kiválthatják a kaveolin1 fokozott expresszióját, akár kaveolák megjelenését is, a központi idegrendszer egyéb sejtípusain is.

A kaveolákkal és a hozzájuk kötődő NTPDáz enzimmel ill. ekto-ATPáz aktivitással kapcsolatos megfigyeléseinket tovább bővítette, amit multidrog rezisztens sejteken tapasztaltunk. A kémiai kezelést szinte lehetetlenné tevő, emiatt is igen veszélyes multidrog-rezisztencia kialakulása során kimutatható, hogy a kaveolinok expressziója megnő, és ezzel megváltozik a sejtek koleszterinháztartása is ²²⁶. A legutóbbi években pedig azt is megtudhattuk, hogy egyes daganatos megbetegedések kialakulása során a rákos szövetek NTPDáz/NTPDáz1 aktivitása is megváltozik ^{173,187,227,228}. Az eredmények azonban nem egy irányba mutatnak, vagy talán lehetséges, hogy szövetenként azért más a reakció, mert maguknak az ektonukleotidázoknak eloszlása eredetileg sem azonos.

A kaveolinok és NTPDázok együttesét az MCF-7 és multidrog rezisztens leszármazottja, az MCF-7-AdR (adriamicinre rezisztens) humán emlő karcinóma sejtek tenyészetén tanulmányoztuk. Eredményeink az ekto-ATPáz aktivitás növekedésére utaltak (66-67. ábra) ^{229,230}.

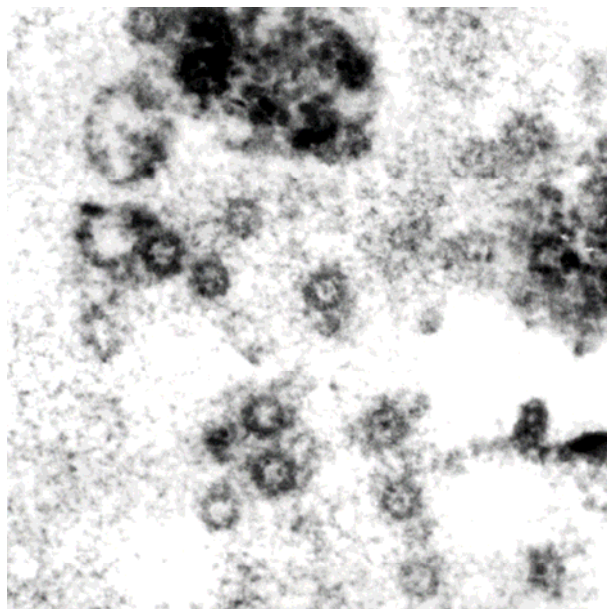


66. ábra MCF-7 sejt ekto-ATPáz aktivitását jelző csapadék a sejtmembránon.

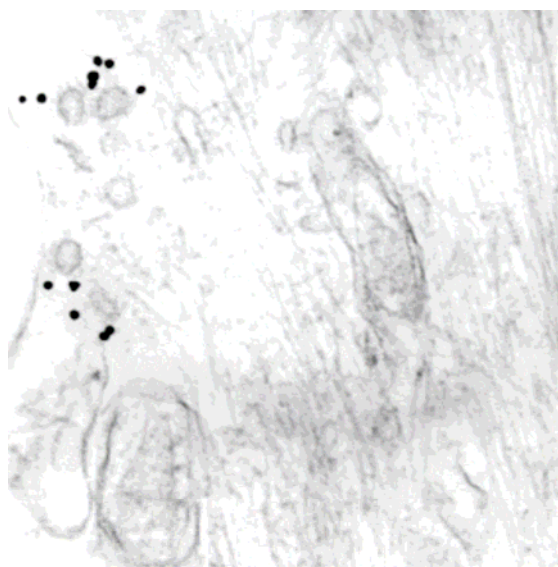


67. ábra MCF-7-AdR sejt. Az ekto-ATPáz aktivitást jelző csapadék a sejt belsejében található vezikulákban. Figyeljük meg, hogy nem minden vezikula jelölődött!

A kaveolákat két különböző immunreakcióval is azonosítottuk (68-69. ábra), melyek egyértelművé tették, hogy valóban kaveolák.

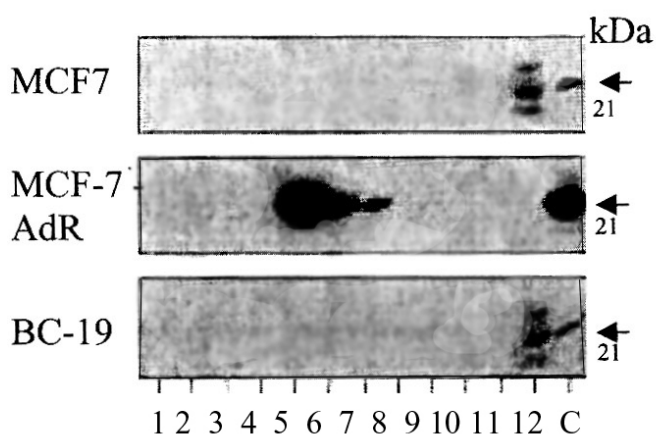


68. ábra MCF-AdR sejt részlete. ABC-DAB reakciótermék a kaveolák membránjában

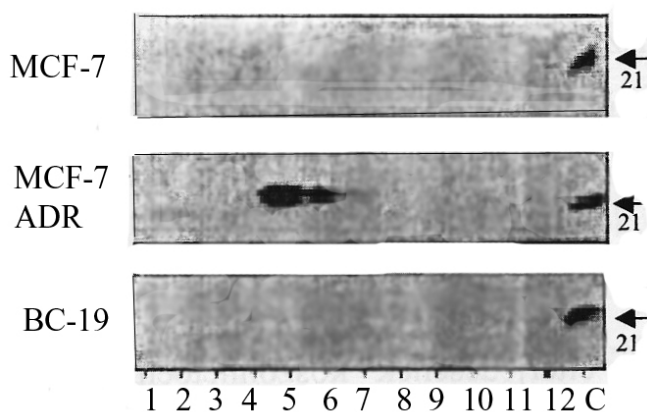


69. ábra Sztreptavidin-kapcsolt arany szemcsék jelzik az MCF-7-AdR sejt kaveoláit

Western blot analízissel kimutattuk, hogy az MCF-7 sejtekben sem kaveolin1, sem kaveolin2 nem található (70. ábra). A multidrog rezisztens MCF-7-AdR sejtekben azonban kétfajta kaveolint is találtunk, a kaveolin1 mellett a gyakorta kísérőmolekulaként szereplő, nála sokkal kevésbé ismert szerepű kaveolin2-t (71. ábra).



70. ábra **Kaveolin1 kimutatása a sejtekből készített biokémiai preparátumban.** A jéghideg lízispufferben homogenizált sejtekhez 1:1 arányban 80 %-os cukoroldatot adtunk, amit cukorgrádiensre rétegeztünk. Ultracentrifugálás után frakciókat gyűjtöttünk, ezekből használtunk az analízisre. A BC–19 sejteket kontrollként alkalmaztuk, bennük kaveolinok nem találhatók. „C” sáv: kaveolin1 kontroll.



71. ábra **Kaveolin2 kimutatása a sejtekből készített biokémiai preparátumban.** A frakciók készítése és az analízis a kaveolin1-nél leírt módon történt

Érdekes nyomon követni a kaveolinokkal kapcsolatos változásokat. Az egészséges epitelsejtekben található kaveolák, míg ez az MCF-7 sejtekre ez nem jellemző. A tumoros sejteknek még a mikrofilamentum szerkezete is más. *(A kaveolinok és főképp az aktinok kapcsolatát is egyre többen vizsgálják!)* Valószínűsíthető, hogy a sejtek közötti kommunikációban is történtek változások. Az egészséges sejtekben az ekto-ATPáz aktivitás nagy része általában a kaveolákhoz kötött ¹⁸⁸. A tumoros transzformáció hatására azonban eltűnt a kaveolák kialakításához szükséges szerkezeti fehérje, a kaveolin, és így nincs szükség arra a poszttranszlációs módosításra sem, ami az NTPDáz 1-et a kaveolához kapcsolná ²⁰. A kaveolák hiányában feltehetőleg nem koncentrálódik a többi jelátvitelben szereplő molekula sem, amelyek egymással való kapcsolatát még nem, vagy csak részben ismerjük. Talán ennek is része van abban, hogy beindul az a reakció, mely végül a malignus transzformáció kialakulásához vezet – ahol ismét megjelenik, méghozzá bőséggel, a kaveolin és most már a kaveolinhoz kötött NTPDáz is. A tumoros transzformáció különböző állomásai tehát a kaveolinok és az NTPDázok esetében is változást idéznek elő. Ha a kísérleti eredmények ma még sok esetben ellentmondónak tűnnek is, ez nem változtat azon a tényen, hogy a kaveolinok és NTPDázok viszonyának, a purinerg szabályozásnak feltárása ezekben folyamatokban gyógyászati jelentőséggel is bír. Egyes *in vitro* kísérletek arról számolnak be, hogy extracelluláris ATP a P2 receptorok aktiválásával gátolta daganatok kialakulását ^{231,232} és emiatt a daganatos terápiában való lehetséges alkalmazásukat fontolgatják. ^{233,234}. Lehetséges, hogy a jelátviteli folyamatokban okoz zavart az NTPDáz1 hiánya, és ez elősegíti a tumoros transzformációt, de ugyanígy az is elképzelhető, hogy az enzim aktivitásának csökkenése-eltűnése épp a tumoros transzformáció eredménye. „Csak” ennek a kérdésnek megválaszolása is fontos lépés lehet a daganatos betegségek gyógyításában.

ÖSSZEGZÉS

A purinerg jelátvitel megértése és esetleges szabályozása nem lehet teljes az ekto-ATPázok/NTPDázok és purinoceptorok s a most már bizonyítottan mindkettővel kapcsolatban álló kaveolinok-kaveolák viszonyának feltárása nélkül.

Kimutattuk az ekto-ATPázokat számos sejtben, különböző szövetekben és fajokban és ennek során megállapítottuk, hogy eloszlásuk eltérő fajok azonos szövetében is különböző lehet. Az NTPDázok közül az NTPDáz1-et és NTPDáz2-öt azonosítottuk, így erről a két enzimről kimondható, hogy kifejeződésük fajspecifikus.

Leírtunk olyan sejteket is (*pl. emberi hasnyálmirigy duktális epitélsejtjei*) melyek tartalmazták ugyan az enzimet (NTPDáz1), de inaktív formában. Elképzelhető, hogy ez is a fajspecifitás egy megjelenési formája, hiszen a fehérje *pl. egér* esetében ugyanilyen sejtekben aktivitást mutatott.

Fajspecifitásra utalhat NTPDáz2 esetében is az a tény, hogy *egér* szövetek ereinek endotélsejtjeiben azonosítottuk a sejtek bazális oldalán, míg *patkány* és *emberi* szövetekben csak az erek támasztósejtjeiben mutatták ki.

Kísérleti eredményeink alátámasztották, hogy endotél- és izomsejtek mellett jelentős ekto-ATPáz aktivitással rendelkező sejtek közé tartoznak az idegszövet sejtjei is, azonban eloszlásuk az idegi és gliaelemeken fajtól függő, ezért minden bizonnyal feladatuk is különböző. Nemcsak a központi idegrendszer különböző területein, ganglionban, de *emberi* és *egér* pankréász idegi elemein is leírtuk az NTPDáz1-et ill. NTPDáz2-t, ami ezeknek az enzimeknek a purinerg szabályozásban való széleskörű szerepét igazolja.

Több sejtfeleségben is kimutattuk, hogy a kaveolák ekto-ATPáz aktivitású enzimet tartalmaznak és immunfestéssel igazoltuk is az NTPDáz1 jelenlétét. Megállapítottuk, hogy egy poszttranszlációs módosulás szükséges a kaveolin és az NTPDáz1 közötti kötés létrejöttéhez. Enzimhisztokémiai és biokémiai aktivitásmérésekkel igazoltuk, hogy

itt az NTPDáz1 sok, a kaveolákban szintén megkötődő receptorfehérjével, jelátvitelben szereplő molekulával ellentétben aktív formában rögzül.

Endotélsejtek kaveoláiban azonosítottuk az NTPDáz1 mellett a P2Y1 receptort is. Más P2 receptort a kaveolákban nem találtunk, s ez jelezheti, hogy az NTPDázok csak bizonyos purinoceptorokkal működnek együtt, ami, a különböző purinoceptorok eltérő eloszlását ismerve, az NTPDázok szerepét a purinerg folyamatok térbeli szabályozásában is felveti.

Az ekto-ATPázok/NTPDázok sokoldalúságát bizonyítja, hogy a purinerg szabályozáson kívül sejtkapcsolatok létrehozásában, stabilizálásában, ezzel egy szövet-szerv struktúrájának kiépítésében is részt vehetnek, mint ezt emberi hipofízis tenyészetben és szövetben bemutattuk.

Adatokat nyertünk arról, hogy az enzim expressziója és aktivitása nemcsak a szomszédos sejt ill. az onnan érkező jelek hatására változhat, de befolyásolhatják élettani vagy annál is kisebb dózisnak megfelelő sugárzások, patológiás folyamatok is. Ilyen esetekben az enzim aktivitásának-expressziójának növekedését figyeltük meg, ami az NTPDáz1 a szív-és érrendszerben más szempontból már leírt védő szerepét erősíti.

A tumoros transzformációk során ugyancsak változik az enzim kifejeződése, aktivitása. Egyrészt megfigyeltük aktivitásának csökkenését a tumorok kialakulásakor (*emberi hasnyálmirigy adenokarcinoma*), másrészt aktivitásának nagymértékű növekedését multidrogrezisztens sejtekben. Valószínű, hogy az expresszióváltozás mindkét esetben a sejt túlélését segíti, csak amíg a rákos sejt esetében a sejtek megnövekedett motilitását úgy tűnik, az enzim inkább akadályozná, a multidrogrezisztens változatnál már a sejt életben maradását, túlélését segíti.

In vivo és *in vitro* kísérletekkel igazoltuk, hogy a kaveolák megjelenése, kaveolin-tartalma és a sejtek ekto-ATPáz aktivitása között gyulladásos folyamatokban és multidrogrezisztencia kialakulásakor összefüggés van.

Reményünk szerint a fentebb felsorolt, az NTPDázok és kaveolák kapcsolatának megismeréséhez hozzájáruló, kiemelt eredményeinknek része lehet abban, hogy az NTPDázokat és kaveolinokat mihamarabb alkamazzák a gyógyászatban.

A szív-és érrendszeri elváltozások okozta megbetegedések, valamint a daganatos betegségek *(különös tekintettel a ma még gyógyíthatatlannak tekinthető hasnyálmirigydaganatokra és a multidrogrezisztenciára)* igen nagy terhet rónak a társadalomra. Magyarországon a kardiovaszkuláris megbetegedések foglalják el az első helyet a halálokok népességi statisztikájában. E betegségek döntő többségének hátterében pedig az érrendszer aterotrombotikus elváltozása áll. A meghatározó rizikótényezők között a magas vérnyomás után az endotél diszfunkció szerepel, s ebben el nem hanyagolható szerepe van az NTPDáz1 aktivitás csökkenésének. Az endoteliális NTPDáz1-ről minden vizsgált szöveten hasonló eredményt kaptunk. A vad típusú és génkiütött egér szövetein kapott enzim-és immunhisztokémiai vizsgálatok azt is tanúsították, hogy az ekto-ATPáz aktivitás annyira fontos, hogy az NTPDáz1 hiánya esetében az NTPDáz2 jelenik meg nagyobb mennyiségben és próbálja meg legalább részben átvenni az NTPDáz1 szerepét és ezzel hozzájárulni az egyed életben maradásához. Mindez támogatja az NTPDáz1 fehérje szolubilis formájának (solCD39) kezelések, műtétek során való alkalmazását, hiszen a trombotikus folyamatok kialakulásának megakadályozása csökkenti a műtéti komplikációkat.

A kaveolinokra is „fényes jövő” várhat a betegségmegelőzésben és gyógyászatban. A kaveolin3 izombetegségek kialakulásában való fontossága már régen nem vitatott, a különböző kaveolinok és a tumoros folyamatok, a multidrogrezisztencia kialakulása közti kapcsolatról naponta jelennek meg újabb eredmények. A kísérleteink szerint ischémiára, gyulladásos folyamatok okozta elváltozásokra a kaveolin3-nál jóval kevésbé érzékenynek tűnő, szívizomsejtekben először általunk megtalált kaveolin1-nek esetleg épp a kardiovaszkuláris megbetegedések kezelésében jut majd szerep. Ez annál is könnyebben elképzelhető, mert a kaveolin1 szérumból történő kimutatását máris megoldották²³⁵.

Irodalom

1. Burnstock, G. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* **24**, 509-81 (1972).
2. Robson, S.C. et al. Ectonucleotidases of CD39 family modulate vascular inflammation and thrombosis in transplantation. *Semin Thromb Hemost* **31**, 217-33 (2005).
3. Vlajkovic, S.M. et al. Noise exposure induces up-regulation of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases 1 and 2 in rat cochlea. *Neuroscience* **126**, 763-73 (2004).
4. Guckelberger, O. et al. Beneficial effects of CD39/ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1 in murine intestinal ischemia-reperfusion injury. *Thromb Haemost* **91**, 576-86 (2004).
5. Bodin, P. & Burnstock, G. Evidence that release of adenosine triphosphate from endothelial cells during increased shear stress is vesicular. *J Cardiovasc Pharmacol* **38**, 900-8. (2001).
6. Kittel, A. Lipopolysaccharide treatment modifies pH- and cation-dependent ecto-ATPase activity of endothelial cells. *J Histochem Cytochem* **47**, 393-400 (1999).
7. Burnstock, G. Release of vasoactive substances from endothelial cells by shear stress and purinergic mechanosensory transduction. *J Anat* **194**, 335-42. (1999).
8. Braun, N., Zhu, Y., Krieglstein, J., Culmsee, C. & Zimmermann, H. Upregulation of the enzyme chain hydrolyzing extracellular ATP after transient forebrain ischemia in the rat. *J Neurosci* **18**, 4891-4900 (1998).
9. Robson, S.C. et al. Loss of ATP diphosphohydrolase activity with endothelial cell activation. *J Exp Med* **185**, 153-63. (1997).
10. Candinas, D. et al. Loss of rat glomerular ATP diphosphohydrolase activity during reperfusion injury is associated with oxidative stress reactions. *Thromb Haemost* **76**, 807-12. (1996).
11. Early, R.J., McBride, B.W., Vatnick, I. & Bell, A.W. Chronic heat stress and prenatal development in sheep: II. Placental cellularity and metabolism. *J Anim Sci* **69**, 3610-6 (1991).
12. Wardell, C.F. & Cunnane, T.C. Biochemical machinery involved in the release of ATP from sympathetic nerve terminals. *Br J Pharmacol* **111**, 975-7. (1994).
13. Abraham, E.H. et al. The multidrug resistance (mdr1) gene product functions as an ATP channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 312-6. (1993).
14. Cantiello, H.F. et al. cAMP activates an ATP-conductive pathway in cultured shark rectal gland cells. *Am J Physiol* **272**, C466-75. (1997).
15. Rabasseda, X., Solsona, C., Marsal, J., Egea, G. & Bizzini, B. ATP release from pure cholinergic synaptosomes is not blocked by tetanus toxin. *FEBS Lett* **213**, 337-40 (1987).
16. von Kugelgen, I., Allgaier, C., Schobert, A. & Starke, K. Co-release of noradrenaline and ATP from cultured sympathetic neurons. *Neuroscience* **61**, 199-202 (1994).
17. Castillo, C.J. et al. Diadenosine tetraphosphate is co-released with ATP and catecholamines from bovine adrenal medulla. *J Neurochem* **59**, 723-32 (1992).
18. Oe, K. et al. Modulation of norepinephrine release by ATP-dependent K(+)-channel activators and inhibitors in guinea-pig and human isolated right atrium. *Cardiovasc Res* **43**, 125-34 (1999).
19. Kittel, A., Csapo, Z.S., Csizmadia, E., Jackson, S.W. & Robson, S.C. Co-localization of P2Y1 receptor and NTPDase1/CD39 within caveolae in human placenta. *Eur J Histochem* **48**, 253-9 (2004).
20. Koziak, K. et al. Palmitoylation targets CD39/endothelial ATP diphosphohydrolase to caveolae. *J Biol Chem* **275**, 2057-62. (2000).
21. Kittel, A. et al. Localization of Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase-1 (NTPDase1) and NTPDase2 in Pancreas and Salivary Gland. *J Histochem Cytochem* **52**, 861-71 (2004).
22. Sevigny, J. et al. Differential catalytic properties and vascular topography of murine nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase1) and NTPDase2 have implications for thromboregulation. *Blood* **99**, 2801-9. (2002).
23. Zimmermann, H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **362**, 299-309. (2000).
24. Dhalla, N.S. & Zhao, D. Cell membrane Ca²⁺/Mg²⁺ ATPase. *Prog Biophys Mol Biol* **52**, 1-37 (1988).

25. Zimmermann, H. & Braun, N. Extracellular metabolism of nucleotides in the nervous system. *J Auton Pharmacol* **16**, 397-400. (1996).
26. Harrison, G., Shapiro, I.M. & Golub, E.E. The phosphatidylinositol-glycolipid anchor on alkaline phosphatase facilitates mineralization initiation in vitro. *J Bone Miner Res* **10**, 568-73. (1995).
27. Repaske, D.R., Swinnen, J.V., Jin, S.L., Van Wyk, J.J. & Conti, M. A polymerase chain reaction strategy to identify and clone cyclic nucleotide phosphodiesterase cDNAs. Molecular cloning of the cDNA encoding the 63-kDa calmodulin-dependent phosphodiesterase. *J Biol Chem* **267**, 18683-8 (1992).
28. Airas, L. & Jalkanen, S. CD73 mediates adhesion of B cells to follicular dendritic cells. *Blood* **88**, 1755-64. (1996).
29. Kitakaze, M. et al. Activation of ecto-5'-nucleotidase by protein kinase C attenuates irreversible cellular injury due to hypoxia and reoxygenation in rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* **28**, 1945-55. (1996).
30. Plesner, L. Ecto-ATPases: Identities and functions. *International Review of Cytology* **158**, 141-214 (1995).
31. Zimmermann, H. et al. Proposed nomenclature for two novel nucleotide hydrolysing enzyme families expressed on the cell surface. in *Ecto-ATPases and Related Ecto-nucleotidase* (eds. Vanduffel, L. & Lemmens, R.) 1-8 (Shaker Publishing B.V., Maastricht, The Netherlands, 1999).
32. Traverso-Cori, A. & Cori, O. Splitting of the terminal phosphate group of adenosine triphosphate by potato apyrase. *Biochim Biophys Acta* **57**, 158-60 (1962).
33. Liebecq, C., Lallemand, A. & Degueldre-Guillaume, M.J. The apyrase activity of potato extract. *Arch Biochem Biophys* **97**, 609-10 (1962).
34. Maliszewski, C.R. et al. The CD39 lymphoid cell activation antigen. Molecular cloning and structural characterization. *J Immunol* **153**, 3574-83. (1994).
35. Kaczmarek, E. et al. Identification and characterization of CD39 vascular ATP diphosphohydrolase. *J Biol Chem* **271**, 33116-33122 (1996).
36. Chadwick, B.P. & Frischauf, A.M. Cloning and mapping of a human and mouse gene with homology to ecto-ATPase genes. *Mamm Genome* **8**, 668-672 (1997).
37. Komoszynski, M.A. & Skalska, E. Ca²⁺-stimulated organic pyrophosphatase--a new plant phosphohydrolase from wheat seedling microsomes. *Acta Biochim Pol* **37**, 405-16 (1990).
38. Komoszynski, M.A. Comparative studies on animal and plant apyrases (ATP diphosphohydrolase EC 3.6.1.5) with application of immunological techniques and various ATPase inhibitors. *Comparative Biochemistry and Physiology* **113**, 581-591 (1996).
39. Komoszynski, M. & Wojtczak, A. Apyrases (ATP diphosphohydrolases, EC 3.6.1.5): Function and relationship to ATPases. *Biochimica et Biophysica Acta* **1310**, 233-241 (1996).
40. Robson, S.C., Sevigny, J., Imai, M., Guckelberger, O. & Enjyoji, K. Thromboregulatory potential of endothelial CD39/nucleoside triphosphate diphosphohydrolase: modulation of purinergic signalling in platelets. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* **4**, 155-171 (2000).
41. Kirley, T.L. The Mg²⁺-ATPase of rabbit skeletal-muscle transverse tubule is a highly glycosylated multiple-subunit enzyme. *Biochem J* **278**, 375-80. (1991).
42. Zhong, X., Malhotra, R., Woodruff, R. & Guidotti, G. Mammalian plasma membrane ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1, CD39, is not active intracellularly. The N-glycosylation state of CD39 correlates with surface activity and localization. *J Biol Chem* **276**, 41518-25. (2001).
43. Wang, T.F., Ou, Y. & Guidotti, G. The transmembrane domains of ectoapyrase (CD39) affect its enzymatic activity and quaternary structure. *J Biol Chem* **273**, 24814-21 (1998).
44. Crack, B.E. et al. Pharmacological and biochemical analysis of FPL 67156, a novel, selective inhibitor of ecto-ATPase. *Br J Pharmacol* **114**, 475-81. (1995).
45. Westfall, T.D., Kennedy, C. & Sneddon, P. Enhancement of sympathetic purinergic neurotransmission in the guinea-pig isolated vas deferens by the novel ecto-ATPase inhibitor ARL 67156. *Br J Pharmacol* **117**, 867-72. (1996).
46. Kittel, A. Role of ecto-ATPases, based on histochemical investigations. Evidences and doubts. in *Ecto-ATPases: Recent progress on structure and function* (eds. Plesner, L., Kirley, T. & Knowles, A.F.) 65-72 (Plenum Publishing Corporation, New York, 1997).

47. Gendron, F.P. et al. Purine signaling and potential new therapeutic approach: possible outcomes of NTPDase inhibition. *Curr Drug Targets* **3**, 229-45. (2002).
48. Handa, M. & Guidotti, G. Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Biochem Biophys Res Commun* **218**, 916-23. (1996).
49. Bigonnesse, F. et al. Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8. *Biochemistry* **43**, 5511-9 (2004).
50. Zimmermann, H. Two novel families of ectonucleotidases: molecular structures, catalytic properties and a search for function. *Trends Pharmacol Sci* **20**, 231-6. 6_00001293 6_00001293 (1999).
51. Braun, N. et al. Assignment of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1/cd39 expression to microglia and vasculature of the brain [In Process Citation]. *Eur J Neurosci* **12**, 4357-66 (2000).
52. Vollmayer, P. et al. Multiple ecto-nucleotidases in PC12 cells: identification and cellular distribution after heterologous expression. *J Neurochem* **78**, 1019-28. (2001).
53. Braun, N. et al. Association of the ecto-ATPase NTPDase2 with glial cells of the peripheral nervous system. *Glia* **45**, 124-32 (2004).
54. Kukulski, F., Sevigny, J. & Komoszynski, M. Comparative hydrolysis of extracellular adenine nucleotides and adenosine in synaptic membranes from porcine brain cortex, hippocampus, cerebellum and medulla oblongata. *Brain Res* **1030**, 49-56 (2004).
55. Chadwick, B.P. & Frischauf, A.M. The CD39-like gene family: identification of three new human members (CD39L2, CD39L3, and CD39L4), their murine homologues, and a member of the gene family from *Drosophila melanogaster*. *Genomics* **50**, 357-67 (1998).
56. Dranoff, J.A. et al. The ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase NTPDase2/CD39L1 is expressed in a novel functional compartment within the liver. *Hepatology* **36**, 1135-44. (2002).
57. Dranoff, J.A. et al. Ectonucleotidase NTPDase2 is selectively down-regulated in biliary cirrhosis. *J Invest Med* **52**, 475-82 (2004).
58. Kishore, B.K. et al. Expression of NTPDase1 and NTPDase2 in murine kidney: relevance to regulation of P2 receptor signaling. *Am J Physiol Renal Physiol* **288**, F1032-43 (2005).
59. Sevigny, J. et al. Identification and characterization of a novel hepatic canalicular ATP diphosphohydrolase. *J Biol Chem* **275**, 5640-7 (2000).
60. Yeung, G., Mulero, J.J., McGowan, D.W., Bajwa, S.S. & Ford, J.E. CD39L2, a gene encoding a human nucleoside diphosphatase, predominantly expressed in the heart. *Biochemistry* **39**, 12916-23 (2000).
61. Mendes, A., Desgranges, C., Cheze, C., Vercauteren, J. & Freslon, J.L. Vasorelaxant effects of grape polyphenols in rat isolated aorta. Possible involvement of a purinergic pathway. *Fundam Clin Pharmacol* **17**, 673-81 (2003).
62. Kukley, M., Barden, J.A., Steinhäuser, C. & Jabs, R. Distribution of P2X receptors on astrocytes in juvenile rat hippocampus. *Glia* **36**, 11-21 (2001).
63. Bultmann, R., Trendelenburg, M., Tuluc, F., Wittenburg, H. & Starke, K. Concomitant blockade of P2X-receptors and ecto-nucleotidases by P2- receptor antagonists: functional consequences in rat vas deferens. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **359**, 339-44. (1999).
64. Braun, N. & Zimmermann, H. Association of Ecto-5'-nucleotidase with specific cell types in the adult and developing rat olfactory organ. *J Comp Neurol* **393**, 528-537 (1998).
65. Beigi, R.D., Kertesz, S.B., Aquilina, G. & Dubyak, G.R. Oxidized ATP (oATP) attenuates proinflammatory signaling via P2 receptor-independent mechanisms. *Br J Pharmacol* **140**, 507-19 (2003).
66. Beigi, R.D. & Dubyak, G.R. Endotoxin activation of macrophages does not induce ATP release and autocrine stimulation of P2 nucleotide receptors. *J Immunol* **165**, 7189-98 (2000).
67. Alvarado-Castillo, C., Harden, T.K. & Boyer, J.L. Regulation of P2Y1 receptor-mediated signaling by the ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase isozymes NTPDase1 and NTPDase2. *Mol Pharmacol* **67**, 114-22 (2005).

68. Joseph, S.M., Buchakjian, M.R. & Dubyak, G.R. Colocalization of ATP release sites and ecto-ATPase activity at the extracellular surface of human astrocytes. *J Biol Chem* **278**, 23331-42 (2003).
69. Palade, G.E. Fine structure of blood capillaries. *J. Appl. Phys.* **24**, 1424 (1953).
70. Yamada, E. The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *J.Biophys.Biochem.Cytol.* **1**, 445-458 (1955).
71. Prescott, L. & Brightman, M.W. The sarcolemma of Aplysia smooth muscle in freeze-fracture preparations. *Tissue Cell* **8**, 248-58 (1976).
72. Schmalbruch, H. A freeze-fracture study of the plasma membrane of muscle fibres of a patient with chronic creatine kinase elevation suspected for malignant hyperthermia. *J Neuropathol Exp Neurol* **38**, 407-18 (1979).
73. Glenney, J.R., Jr. & Soppet, D. Sequence and expression of caveolin, a protein component of caveolae plasma membrane domains phosphorylated on tyrosine in Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 10517-21 (1992).
74. Couet, J., Belanger, M.M., Roussel, E. & Drolet, M.C. Cell biology of caveolae and caveolin. *Adv Drug Deliv Rev* **49**, 223-35 (2001).
75. Parton, R.G. & Richards, A.A. Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms. *Traffic* **4**, 724-38 (2003).
76. Isshiki, M. et al. Sites of Ca(2+) wave initiation move with caveolae to the trailing edge of migrating cells. *J Cell Sci* **115**, 475-84 (2002).
77. Dhillon, B. et al. Caveolin: a key target for modulating nitric oxide availability in health and disease. *Mol Cell Biochem* **247**, 101-9 (2003).
78. Ju, H. et al. Bradykinin activates the Janus-activated kinase/signal transducers and activators of transcription (JAK/STAT) pathway in vascular endothelial cells: localization of JAK/STAT signalling proteins in plasmalemmal caveolae. *Biochem J* **351**, 257-64 (2000).
79. Volonte, D. et al. Flotillins/cavatellins are differentially expressed in cells and tissues and form a hetero-oligomeric complex with caveolins in vivo. Characterization and epitope-mapping of a novel flotillin-1 monoclonal antibody probe. *J Biol Chem* **274**, 12702-9 (1999).
80. Li, L., Ren, C.H., Tahir, S.A., Ren, C. & Thompson, T.C. Caveolin-1 maintains activated Akt in prostate cancer cells through scaffolding domain binding site interactions with and inhibition of serine/threonine protein phosphatases PP1 and PP2A. *Mol Cell Biol* **23**, 9389-404 (2003).
81. Li, S. et al. Evidence for a regulated interaction between heterotrimeric G proteins and caveolin. *Journal Of Biological Chemistry* **270**, 15693-701 (1995).
82. Li, H. & Nord, E.P. Functional caveolae are a prerequisite for CD40 signaling in human renal proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol* **286**, F711-9 (2004).
83. Li, C., Huang, W., Harris, M.B., Goolsby, J.M. & Venema, R.C. Interaction of the endothelial nitric oxide synthase with the CAT-1 arginine transporter enhances NO release by a mechanism not involving arginine transport. *Biochem J* **386**, 567-74 (2005).
84. Ito, J., Li, H., Nagayasu, Y., Kheirollah, A. & Yokoyama, S. Apolipoprotein A-I induces translocation of protein kinase C[alpha] to a cytosolic lipid-protein particle in astrocytes. *J Lipid Res* **45**, 2269-76 (2004).
85. Goligorsky, M.S., Li, H., Brodsky, S. & Chen, J. Relationships between caveolae and eNOS: everything in proximity and the proximity of everything. *Am J Physiol Renal Physiol* **283**, F1-10 (2002).
86. Dong, F. et al. Endothelin-1 enhances oxidative stress, cell proliferation and reduces apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: role of ETB receptor, NADPH oxidase and caveolin-1. *Br J Pharmacol* **145**, 323-33 (2005).
87. Zhang, W. et al. Protein-protein interactions involving inducible nitric oxide synthase. *Acta Physiol Scand* **179**, 137-42 (2003).
88. Parton, R.G. Caveolae meet endosomes: a stable relationship? *Dev Cell* **7**, 458-60 (2004).
89. Pang, A., Au, W.Y. & Kwong, Y.L. Caveolin-1 gene is coordinately regulated with the multidrug resistance 1 gene in normal and leukemic bone marrow. *Leuk Res* **28**, 973-7 (2004).
90. Kim, S. & Pak, Y. Caveolin-2 regulation of the cell cycle in response to insulin in Hirc-B fibroblast cells. *Biochem Biophys Res Commun* **330**, 88-96 (2005).

91. Yamamoto, M., Toya, Y., Jensen, R.A. & Ishikawa, Y. Caveolin is an inhibitor of platelet-derived growth factor receptor signaling. *Exp Cell Res* **247**, 380-8 (1999).
92. Ravid, D., Maor, S., Werner, H. & Liscovitch, M. Caveolin-1 inhibits cell detachment-induced p53 activation and anoikis by upregulation of insulin-like growth factor-I receptors and signaling. *Oncogene* **24**, 1338-47 (2005).
93. Pelligrino, D.A. & Galea, E. Estrogen and cerebrovascular physiology and pathophysiology. *Jpn J Pharmacol* **86**, 137-58 (2001).
94. Fujita, T. et al. Accumulation of molecules involved in alpha1-adrenergic signal within caveolae: caveolin expression and the development of cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res* **51**, 709-16 (2001).
95. Xu, H.L., Galea, E., Santizo, R.A., Baughman, V.L. & Pelligrino, D.A. The key role of caveolin-1 in estrogen-mediated regulation of endothelial nitric oxide synthase function in cerebral arterioles in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab* **21**, 907-13 (2001).
96. Williams, T.M. & Lisanti, M.P. The Caveolin genes: from cell biology to medicine. *Ann Med* **36**, 584-95 (2004).
97. Wang, Q. et al. Extracellular matrix activity and caveolae events contribute to cell surface receptor activation that leads to MAP kinase activation in response to UV irradiation in cultured human keratinocytes. *Int J Mol Med* **15**, 633-40 (2005).
98. Lupu, C., Hu, X. & Lupu, F. Caveolin-1 enhances tissue factor pathway inhibitor exposure and function on the cell surface. *J Biol Chem* **280**, 22308-17 (2005).
99. Yang, G., Timme, T.L., Frolov, A., Wheeler, T.M. & Thompson, T.C. Combined c-Myc and caveolin-1 expression in human prostate carcinoma predicts prostate carcinoma progression. *Cancer* **103**, 1186-94 (2005).
100. Williams, T.M. et al. Caveolin-1 promotes tumor progression in an autochthonous mouse model of prostate cancer: Genetic ablation of Cav-1 delays advanced prostate tumor development in TRAMP mice. *J Biol Chem* (2005).
101. Williams, T.M. & Lisanti, M.P. Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis. *Am J Physiol Cell Physiol* **288**, C494-506 (2005).
102. Williams, T.M. et al. Caveolin-1 gene disruption promotes mammary tumorigenesis and dramatically enhances lung metastasis in vivo. Role of Cav-1 in cell invasiveness and matrix metalloproteinase (MMP-2/9) secretion. *J Biol Chem* **279**, 51630-46 (2004).
103. Sonveaux, P. et al. Caveolin-1 expression is critical for vascular endothelial growth factor-induced ischemic hindlimb collateralization and nitric oxide-mediated angiogenesis. *Circ Res* **95**, 154-61 (2004).
104. Contag, C.H. & Bachmann, M.H. Molecular medicine: the writing is on the vessel wall. *Nature* **429**, 618-9 (2004).
105. Burnstock, G. A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. in *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: A Multidisciplinary Approach* (eds. Straub, R.W. & Bolis, L.) 107-118 (Raven Press, New York, 1978).
106. Abbracchio, M.P. & Burnstock, G. Purinergic signalling: pathophysiological roles. *Jpn J Pharmacol* **78**, 113-45. (1998).
107. Alavi, A.M., Dubyak, G.R. & Burnstock, G. Immunohistochemical evidence for ATP receptors in human dental pulp. *J Dent Res* **80**, 476-83. (2001).
108. Bo, X. et al. Localization of ATP-gated P2X2 and P2X3 receptor immunoreactive nerves in rat taste buds. *Neuroreport* **10**, 1107-11. (1999).
109. Burnstock, G. & Wood, J.N. Purinergic receptors: their role in nociception and primary afferent neurotransmission. *Curr Opin Neurobiol* **6**, 526-32. (1996).
110. Burnstock, G. Purine-mediated signalling in pain and visceral perception. *Trends Pharmacol Sci* **22**, 182-8. (2001).
111. Cockayne, D.A. et al. Urinary bladder hyporeflexia and reduced pain-related behaviour in P2X3-deficient mice. *Nature* **407**, 1011-5 (2000).
112. Ding, Y., Cesare, P., Drew, L., Nikitaki, D. & Wood, J.N. ATP, P2X receptors and pain pathways. *J Auton Nerv Syst* **81**, 289-94 (2000).

113. Wynn, G., Rong, W., Xiang, Z. & Burnstock, G. Purinergic mechanisms contribute to mechanosensory transduction in the rat colorectum. *Gastroenterology* **125**, 1398-409 (2003).
114. Baraldi, P.G., Di Virgilio, F. & Romagnoli, R. Agonists and antagonists acting at P2X7 receptor. *Curr Top Med Chem* **4**, 1707-17 (2004).
115. Madarasz, E., Theodosis, D.T. & Poulain, D.A. In vitro formation of type 2 astrocytes derived from postnatal rat hypothalamus or cerebral cortex. *Neuroscience* **43**, 211-21 (1991).
116. Bacsy, E., Gyevai, A., Szabo, M., Nagy, I. & Sotonyi, P. Morphological and functional characterization of cell cultures from adult human adenohypophyses. *Acta Histochem Suppl* **42**, 231-7 (1992).
117. Kittel, A., Kalmár, B. & Madarász, E. Effects of LPS on ecto-ATPase (NTPDase) activity and phagocytosis of cultured astrocytes. in *Second International Workshop on Ecto-ATPases and Related Ecto-nucleotidases* (eds. Vanduffel, L. & Lemmens, R.) 158-166 (Shaker Publishing B.V. Maastricht, The Netherlands, Diepenbeek, Belgium, 1999).
118. Kalmar, B., Kittel, A., Lemmens, R., Kornyei, Z. & Madarasz, E. Cultured astrocytes react to LPS with increased cyclooxygenase activity and phagocytosis. *Neurochem Int* **38**, 453-61. (2001).
119. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54. (1976).
120. LeBel, D., Poirier, G.G. & Beaudoin, A.R. A Convenient Method for the ATPase Assay. *Analytical Biochemistry* **85**, 86-89 (1978).
121. Baykov, A.A., Evtushenko, O.A. & Avaeva, S.M. A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay. *Anal Biochem* **171**, 266-70. (1988).
122. Sperlagh, B., Kittel, A., Lajtha, A. & Vizi, E.S. ATP acts as fast neurotransmitter in rat habenula: neurochemical and enzyme histochemical evidence. *Neuroscience* **66**, 915-20. (1995).
123. Kittel, A., Siklós, L., Thuróczy, G. & Somosy, Z. Qualitative enzyme histochemistry and microanalysis reveals changes in ultrastructural distribution of calcium and calcium-activated ATPases after microwave irradiation of the medial habenula. *Acta Neuropathol (Berl)* **92**, 362-8 (1996).
124. Grohovaz, F., Bossi, M., Pezzati, R., Meldolesi, J. & Tarelli, F.T. High resolution ultrastructural mapping of total calcium: electron spectroscopic imaging/electron energy loss spectroscopy analysis of a physically/chemically processed nerve-muscle preparation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 4799-803 (1996).
125. Tokuyasu, K.T. Application of cryoultramicrotomy to immunocytochemistry. *J Microsc* **143**, 139-49. (1986).
126. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5. (1970).
127. Lavie, Y., Fiucci, G. & Liscovitch, M. Up-regulation of caveolae and caveolar constituents in multidrug-resistant cancer cells. *J Biol Chem* **273**, 32380-3 (1998).
128. Burnstock, G. Overview. Purinergic mechanisms. *Ann N Y Acad Sci* **603**, 1-17 (1990).
129. Edwards, F.A., Gibb, A.J. & Colquhoun, D. ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system [see comments]. *Nature* **359**, 144-7 (1992).
130. Edwards, F.A. & Gibb, A.J. ATP--a fast neurotransmitter. *FEBS Lett* **325**, 86-9 (1993).
131. Nitahara, K., Kittel, A., Liang, S.D. & Vizi, E.S. A1-receptor-mediated effect of adenosine on the release of acetylcholine from the myenteric plexus: role and localization of ecto-ATPase and 5'-nucleotidase. *Neuroscience* **67**, 159-68 (1995).
132. Kittel, A. Distribution of Ca-ATPases in the medial habenula in mouse. *Scanning Microscopy* **8**, 337-42; discussion 343 (1994).
133. Vizi, E.S., Liang, S.D., Sperlagh, B., Kittel, A. & Jurányi, Z. Studies on the release and extracellular metabolism of endogenous ATP in rat superior cervical ganglion: support for neurotransmitter role of ATP. *Neuroscience* **79**, 893-903 (1997).
134. Loesch, A., Miah, S. & Burnstock, G. Ultrastructural localisation of ATP-gated P2X2 receptor immunoreactivity in the rat hypothalamo-neurohypophysial system. *J Neurocytol* **28**, 495-504. (1999).

135. Loesch, A. & Burnstock, G. Immunoreactivity to P2X(6) receptors in the rat hypothalamo-neurohypophyseal system: an ultrastructural study with extravidin and colloidal gold-silver labelling. *Neuroscience* **106**, 621-31 (2001).
136. Kittel, A., Miklós, I. & Bácsy, E. Heterogeneous distribution of ecto-Ca-ATPases in primary cultures of human adenohypophyseal cells. *Scanning Microscopy* **9**, 485-90; discussion 490-2 (1995).
137. Lin, S.C.O.F.D.H.D. Immunochemical characterization of two isoforms of rat liver ecto-ATPase that show an immunological and structural identity with a glycoprotein cell-adhesion molecule with Mr 105,000. *Biochem J* **278**, 155-61 (1991).
138. Turbide, C., Rojas, M., Stanners, C.P. & Beauchemin, N. A mouse carcinoembryonic antigen gene family member is a calcium-dependent cell adhesion molecule. *J Biol Chem* **266**, 309-15 (1991).
139. Murphy, H.C., Hand, A.R. & Dowd, F.J. Localization of an ecto-ATPase/cell-CAM 105 (C-CAM) in the rat parotid and submandibular glands. *J Histochem Cytochem* **42**, 561-8. (1994).
140. Godfraind, C. et al. Tissue and cellular distribution of an adhesion molecule in the carcinoembryonic antigen family that serves as a receptor for mouse hepatitis virus. *Lab Invest* **73**, 615-27. (1995).
141. Zeuthen, J., Dzhandzhugazyan, K., Hansen, M.R. & Kirkin, A.F. The immunogenic properties of human melanomas and melanoma-associated antigens recognized by cytotoxic T lymphocytes. *Bratisl Lek Listy* **99**, 426-34 (1998).
142. Kirley, T.L. Complementary DNA cloning and sequencing of the chicken muscle ecto-ATPase. Homology with the lymphoid cell activation antigen CD39. *J Biol Chem* **272**, 1076-81. (1997).
143. Crack, B.E., Beukers, M.W., McKechnie, K.C., Ijzerman, A.P. & Leff, P. Pharmacological analysis of ecto-ATPase inhibition: evidence for combined enzyme inhibition and receptor antagonism in P2X-purinoreceptor ligands. *Br J Pharmacol* **113**, 1432-8. (1994).
144. Somosy, Z., Kittel, A. & Thuroczy, G. (eds.). *Ultrastructural distribution of calcium after ELF modulated microwave and GSM modulated RF irradiation in the temporal cortex of rat brain.*, 601-604 (Kluwer Academic/Plenum Publisher, 1999).
145. Schnermann, J. & Levine, D.Z. Paracrine factors in tubuloglomerular feedback: adenosine, ATP, and nitric oxide. *Annu Rev Physiol* **65**, 501-29 (2003).
146. North, R.A. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* **82**, 1013-67 (2002).
147. Bailey, M.A. et al. P2Y receptors present in the native and isolated rat glomerulus. *Nephron Physiol* **96**, p79-90 (2004).
148. Nishiyama, A., Rahman, M. & Inscho, E.W. Role of interstitial ATP and adenosine in the regulation of renal hemodynamics and microvascular function. *Hypertens Res* **27**, 791-804 (2004).
149. Komlosi, P., Fintha, A. & Bell, P.D. Renal cell-to-cell communication via extracellular ATP. *Physiology (Bethesda)* **20**, 86-90 (2005).
150. Lemmens, R. et al. Purification, characterization, and localization of an ATP diphosphohydrolase in porcine kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* **278**, F978-88 (2000).
151. Beaudoin, A.R. et al. Localization and physiological role of the ATP diphosphohydrolase in the pancreatic acinar cell. in *Biology of normal and cancerous exocrine pancreatic cells* (eds. Ribet, A., Pradayrol, L. & C., S.) 272-280. (Elsevier Biomedical Press, North Holland, 1980).
152. LeBel, D. et al. Characterization and purification of a calcium-sensitive ATP diphosphohydrolase from pig pancreas. *J Biol Chem* **255**, 1227-33. (1980).
153. Paquet, M.R., St-Jean, P., Roberge, M. & Beaudoin, A.R. Isolation of zymogen granules from rat pancreas and characterization of their membrane proteins. *Eur J Cell Biol* **28**, 20-6 (1982).
154. Beaudoin, A.R., Marois, C., Dunnigan, J. & Morisset, J. Biochemical reactions involved in pancreatic enzyme secretion. I. Activation of the adenylate cyclase complex. *Can J Physiol Pharmacol* **52**, 174-82 (1974).
155. Beaudoin, A.R., Grondin, G., Lord, A., Roberge, M. & St-Jean, P. The origin of the zymogen granule membrane of the pancreatic acinar cell as examined by ultrastructural cytochemistry of acid phosphatase, thiamine pyrophosphatase, and ATP-diphosphohydrolase activities. *PG - 218-25. Eur J Cell Biol* **29**(1983).

156. Beaudoin, A.R. et al. Lipid analysis of a novel type of cell secretion in the exocrine pancreas: the pancreasomes. *Biochim Biophys Acta* **922**, 62-6 (1987).
157. Cabana, C., Magny, P., Nadeau, D., Grondin, G. & Beaudoin, A. Freeze-fracture study of the zymogen granule membrane of pancreas: two novel types of intramembrane particles. *Eur J Cell Biol* **45**, 246-55 (1988).
158. Beaudoin, A.R., St-Jean, P. & Grondin, G. Pancreatic juice composition: new views about the cellular mechanisms that control the concentration of digestive and nondigestive proteins. *Dig Dis* **7**, 210-20 (1989).
159. Withiam-Leitch, M. et al. Glycoprotein 2 of zymogen granule membranes shares immunological cross-reactivity and sequence similarity with phospholipase A2. *Biochem Biophys Res Commun* **194**, 1167-74 (1993).
160. Sevigny, J., Cote, Y.P. & Beaudoin, A.R. Purification of pancreas type-I ATP diphosphohydrolase and identification by affinity labelling with the 5'-p-fluorosulphonylbenzoyl-adenosine ATP analogue. *Biochem J* **312**, 351-56 (1995).
161. Grondin, G., Morisset, J., Beaudoin, A.R. & Lebel, D. Models of exocrine pancreatic pathologies: a microscopical point of view. *Microsc Res Tech* **36**, 324-36 (1997).
162. Forget, G. & Heisler, S. Calcium-activated ATPase activity in a plasma membrane-rich preparation of rat pancreas. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **3**, 67-72 (1976).
163. Chapal, J. & Loubatieres-Mariani, M.M. Attempt to antagonized the stimulatory effect of ATP on insulin secretion. *Eur J Pharmacol* **74**, 127-34 (1981).
164. Chapal, J., Loubatieres-Mariani, M.M., Roye, M. & Zerbib, A. Effects of adenosine, adenosine triphosphate and structural analogues on glucagon secretion from the perfused pancreas of rat in vitro. *Br J Pharmacol* **83**, 927-33. (1984).
165. Hamlyn, J.M. & Senior, A.E. Evidence that Mg²⁺- or Ca²⁺-activated adenosine triphosphatase in rat pancreas is a plasma-membrane ecto-enzyme. *Biochem J* **214**, 59-68 (1983).
166. Loubatieres-Mariani, M.M. & Chapal, J. Purinergic receptors involved in the stimulation of insulin and glucagon secretion. *Diabete Metab* **14**, 119-26 (1988).
167. Hillaire-Buys, D., Chapal, J., Bertrand, G., Petit, P. & Loubatieres-Mariani, M.M. Purinergic receptors on insulin-secreting cells. *Fundam Clin Pharmacol* **8**, 117-27 (1994).
168. Henriksen, K.L. & Novak, I. Effect of ATP on intracellular pH in pancreatic ducts involves P2X7 receptors. *Cell Physiol Biochem* **13**, 93-102 (2003).
169. Ishiguro, H. et al. Luminal ATP stimulates fluid and HCO₃⁻ secretion in guinea-pig pancreatic duct. *J Physiol (Lond)* **519 Pt 2**, 551-8 (1999).
170. Sevigny, J., Grondin, G., Gendron, F.P., Roy, J. & Beaudoin, A.R. Demonstration and immunolocalization of ATP diphosphohydrolase in the pig digestive system. *Am J Physiol* **275**, G473-82. (1998).
171. Sevigny, J., Picher, M., Grondin, G. & Beaudoin, A.R. Purification and immunohistochemical localization of the ATP diphosphohydrolase in bovine lungs. *Am J Physiol* **272**, L939-50. (1997).
172. Chapal, J. et al. Comparative effects of adenosine-5'-triphosphate and related analogues on insulin secretion from the rat pancreas. *Fundam Clin Pharmacol* **11**, 537-45 (1997).
173. Kittel, A., Garrido, M. & Varga, G. Localization of NTPDase1/CD39 in normal and transformed human pancreas. *J Histochem Cytochem* **50**, 549-56. (2002).
174. Kordas, K.S. et al. ATP and ATPase Secretion by Exocrine Pancreas in Rat, Guinea Pig, and Human. *Pancreas* **29**, 53-60 (2004).
175. Benrezzak, O. et al. Identification and immunolocalization of two isoforms of ATP-diphosphohydrolase (ATPDase) in the pig immune system. *Arch Biochem Biophys* **370**, 314-22. (1999).
176. Knowles, A.F. & Nagy, A.K. Inhibition of an ecto-ATP-diphosphohydrolase by azide. *Eur J Biochem* **262**, 349-57 (1999).
177. Stam, N.J., Klomp, J., Van de Heuvel, N. & Olijve, W. Molecular cloning and characterization of a novel orphan receptor (P2P) expressed in human pancreas that shows high structural homology to the P2U purinoceptor. *FEBS Lett* **384**, 260-4. (1996).

178. Chapal, J., Loubatieres-Mariani, M.M. & Roye, M. Effect of adenosine and phosphated derivatives on insulin release from the newborn dog pancreas. *J Physiol (Paris)* **77**, 873-5. (1981).
179. Hillaire-Buys, D., Dietz, S., Chapal, J., Petit, P. & Loubatieres-Mariani, M.M. Involvement of P2X and P2U receptors in the constrictor effect of ATP on the pancreatic vascular bed. *J Soc Biol* **193**, 57-61 (1999).
180. Chapal, J. & Loubatieres-Mariani, M.M. Evidence for purinergic receptors on vascular smooth muscle in rat pancreas. *Eur J Pharmacol* **87**, 423-30. (1983).
181. Chapal, J., Loubatieres-Mariani, M.M., Petit, P. & Roye, M. Evidence for an A2-subtype adenosine receptor on pancreatic glucagon secreting cells. *Br J Pharmacol* **86**, 565-9. (1985).
182. Gross, R., Bertrand, G., Ribes, G. & Loubatieres-Mariani, M.M. Alpha 2-adrenergic potentiation of adenosine-stimulating effect on glucagon secretion. *Endocrinology* **121**, 765-9. (1987).
183. Hillaire-Buys, D., Gross, R., Loubatieres-Mariani, M.M. & Ribes, G. Effect of pertussis toxin on A1-receptor-mediated inhibition of insulin secretion. *Br J Pharmacol* **96**, 3-4. (1989).
184. Beaudoin, A.R. et al. The physiological role of NTPDases (ATP diphosphohydrolases) in mammals. in *Ecto-ATPases and Related Ectonucleotidases*. (eds. Vanduffel, L. & Lemmens, R.) 125-135 (Shaker Publishing B.V., Maastricht, The Netherlands, 1999).
185. Gutensohn, W. & Jahn, H. Qualitative and quantitative differences between Burkitt lymphoma and lymphoblastoid cell lines in the expression of membrane ecto-nucleotidases and in the response to agonists of the A2-type adenosine receptor. *Int J Cancer* **41**, 436-41 (1988).
186. Agteresch, H.J., Dagnelie, P.C., van den Berg, J.W. & Wilson, J.H. Adenosine triphosphate: established and potential clinical applications. *Drugs* **58**, 211-32. (1999).
187. Dzhandzhugazyan, K.N., Kirkin, A.F., thor Straten, P. & Zeuthen, J. Ecto-ATP diphosphohydrolase/CD39 is overexpressed in differentiated human melanomas. *FEBS Lett* **430**, 227-30 (1998).
188. Kittel, A. & Bácsy, E. Ecto-ATPases and 5'-nucleotidases in the caveolae of smooth muscle. Enzyme-histochemical evidence may indicate a role for caveolae in neurotransmission. *Cell Biol Internat* **18**, 875-9 (1994).
189. Kittel, A. et al. CD39 as a caveolar-associated ectonucleotidase. *Biochem Biophys Res Commun* **262**, 596-9 (1999).
190. Anderson, R.G. Caveolae: where incoming and outgoing messengers meet. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 10909-13 (1993).
191. Lasley, R.D. & Smart, E.J. Cardiac myocyte adenosine receptors and caveolae. *Trends Cardiovasc Med* **11**, 259-63 (2001).
192. Liu, L. et al. Role of caveolae in signal-transducing function of cardiac Na⁺/K⁺-ATPase. *Am J Physiol Cell Physiol* **284**, C1550-60 (2003).
193. Peiro, S., Comella, J.X., Enrich, C., Martin-Zanca, D. & Rocamora, N. PC12 cells have caveolae that contain TrkA. Caveolae-disrupting drugs inhibit nerve growth factor-induced, but not epidermal growth factor- induced, MAPK phosphorylation. *J Biol Chem* **275**, 37846-52. (2000).
194. Chambliss, K.L. et al. Estrogen receptor alpha and endothelial nitric oxide synthase are organized into a functional signaling module in caveolae. *Circ Res* **87**, E44-52. (2000).
195. Kim, J.H. et al. Phospholipase D1 in caveolae: regulation by protein kinase C α and caveolin-1. *Biochemistry* **38**, 3763-9 (1999).
196. Isshiki, M. & Anderson, R.G. Calcium signal transduction from caveolae. *Cell Calcium* **26**, 201-8. (1999).
197. Yamamoto, M. et al. Caveolin is an activator of insulin receptor signaling. *Journal Of Biological Chemistry* **273**, 26962-8 (1998).
198. Feron, O. et al. Modulation of the endothelial nitric-oxide synthase-caveolin interaction in cardiac myocytes. Implications for the autonomic regulation of heart rate. *Journal Of Biological Chemistry* **273**, 30249-54 (1998).
199. Song, K.S., Sargiacomo, M., Galbiati, F., Parenti, M. & Lisanti, M.P. Targeting of a G α subunit (Gi1 α) and c-Src tyrosine kinase to caveolae membranes: clarifying the role of N-myristoylation. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **43**, 293-303 (1997).

200. Oka, N. et al. Downregulation of caveolin by chronic beta-adrenergic receptor stimulation in mice. *Am J Physiol* **273**, C1957-62. (1997).
201. Engelman, J.A. et al. Caveolin-mediated regulation of signaling along the p42/44 MAP kinase cascade in vivo. A role for the caveolin-scaffolding domain. *Febs Letters* **428**, 205-11 (1998).
202. Dehouck, B. et al. A new function for the LDL receptor: transcytosis of LDL across the blood-brain barrier. *Journal Of Cell Biology* **138**, 877-89 (1997).
203. Li, S., Couet, J. & Lisanti, M.P. Src tyrosine kinases, Galpha subunits, and H-Ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto-activation of Src tyrosine kinases. *Journal Of Biological Chemistry* **271**, 29182-90 (1996).
204. Sargiacomo, M., Sudol, M., Tang, Z. & Lisanti, M.P. Signal transducing molecules and glycosylphosphatidylinositol-linked proteins form a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells. *J Cell Biol* **122**, 789-807. (1993).
205. Kiss, A.L. & Kittel, A. Early endocytotic steps in elicited macrophages: omega-shaped plasma membrane vesicles at their cell surface. *Cell Biology International* **19**, 527-38 (1995).
206. van Deurs, B., Roepstorff, K., Hommelgaard, A.M. & Sandvig, K. Caveolae: anchored, multifunctional platforms in the lipid ocean. *Trends Cell Biol* **13**, 92-100 (2003).
207. Dömötör, E., Sipos, I., Kittel, A., Abbott, N.J. & Adam-Vizi, V. Improved growth of cultured brain microvascular endothelial cells on glass coated with a biological matrix. *Neurochemistry International* **33**, 473-8 (1998).
208. Lemmens, R. et al. Distribution, cloning, and characterization of porcine nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1. *Eur J Biochem* **267**, 4106-14 (2000).
209. Papanikolaou, A. et al. Cholesterol-dependent lipid assemblies regulate the activity of the ectonucleotidase CD39. *J Biol Chem* (2005).
210. Wang, T.F. & Guidotti, G. Widespread expression of ecto-ATPase (CD39) in the central nervous system. *Brain Res* **790**, 318-22 (1998).
211. Nagy, A.K., Walton, N.Y. & Treiman, D.M. Reduced cortical ecto-ATPase activity in rat brains during prolonged status epilepticus induced by sequential administration of lithium and pilocarpine. *Mol Chem Neuropathol* **31**, 135-47. (1997).
212. de Vries, H.E. et al. Effect of endotoxin on permeability of bovine cerebral endothelial cell layers in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* **277**, 1418-23. (1996).
213. Lu, J.L., Schmiede, L.M., 3rd, Kuo, L. & Liao, J.C. Downregulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase expression by lipopolysaccharide. *Biochem Biophys Res Commun* **225**, 1-5. (1996).
214. Spolarics, Z., Stein, D.S. & Garcia, Z.C. Endotoxin stimulates hydrogen peroxide detoxifying activity in rat hepatic endothelial cells. *Hepatology* **24**, 691-6. (1996).
215. Defazio, G. et al. Endocytosis of horseradish peroxidase by brain microvascular and umbilical vein endothelial cells in culture: an ultrastructural and morphometric study. *Brain Res Bull* **43**, 467-72 (1997).
216. Bourke, W., Kamp, D., Dunn, M. & Chang, S.W. Bacterial toxin-induced pulmonary epithelial cytotoxicity and the protective effect of dibutyryl-cAMP. *Ir J Med Sci* **167**, 19-21. (1998).
217. Kittel, Á., Kiss, A.L., Müllner, N., Matkó, I. & Sperlágh, B. Expression of NTPDase1 and caveolins in human cardiovascular disease. *Histochem Cell Biol*, in press (2005).
218. Franke, H. et al. P2Y receptor expression on astrocytes in the nucleus accumbens of rats. *Neuroscience* **127**, 431-41 (2004).
219. Walz, W., Gimpl, G., Ohlemeyer, C. & Kettenmann, H. Extracellular ATP-induced currents in astrocytes: involvement of a cation channel. *J Neurosci Res* **38**, 12-8 (1994).
220. Kobayashi, T., Okada, T., Garcia del Saz, E. & Seguchi, H. Internalization of ecto-ATPase activity in human neutrophils upon stimulation with phorbol ester or formyl peptide. *Histochem Cell Biol* **107**, 353-63. (1997).
221. Cornford, E.M. & Hyman, S. Localization of brain endothelial luminal and abluminal transporters with immunogold electron microscopy. *NeuroRx* **2**, 27-43 (2005).
222. Gaudreault, S.B., Blain, J.F., Gratton, J.P. & Poirier, J. A role for caveolin-1 in post-injury reactive neuronal plasticity. *J Neurochem* **92**, 831-9 (2005).

223. Zschocke, J., Bayatti, N. & Behl, C. Caveolin and GLT-1 gene expression is reciprocally regulated in primary astrocytes: association of GLT-1 with non-caveolar lipid rafts. *Glia* **49**, 275-87 (2005).
224. Ronaldson, P.T., Bendayan, M., Gingras, D., Piquette-Miller, M. & Bendayan, R. Cellular localization and functional expression of P-glycoprotein in rat astrocyte cultures. *J Neurochem* **89**, 788-800 (2004).
225. Arvanitis, D.N., Wang, H., Bagshaw, R.D., Callahan, J.W. & Boggs, J.M. Membrane-associated estrogen receptor and caveolin-1 are present in central nervous system myelin and oligodendrocyte plasma membranes. *J Neurosci Res* **75**, 603-13 (2004).
226. Liscovitch, M. & Lavie, Y. Multidrug resistance: a role for cholesterol efflux pathways? *Trends Biochem Sci* **25**, 530-4. (2000).
227. Slivinskii, G.G., Bushneva, I.A. & Magda, I.N. A comparative study of the ectophosphatase activity in different subpopulations of tumor cells. *Tsitologiya* **35**, 94-100 (1993).
228. Sembries, S., Pahl, H., Stilgenbauer, S., Dohner, H. & Schriever, F. Reduced expression of adhesion molecules and cell signaling receptors by chronic lymphocytic leukemia cells with 11q deletion. *Blood* **93**, 624-31. (1999).
229. Kittel, A., Komori, N. & Liscovitch, M. Coexistence of ecto-ATPDases and caveolae in multidrug-resistant cancer cells. in *30th Annual SFN Meeting* Vol. 1 pp. 289, 107.6 (New Orleans, USA, 2000).
230. Kittel, A., Varga, G. & Liscovitch, M. Ecto-ATPases and caveolae in multidrug-resistant cancer cells. *Eur J Neurosci* **12**, 225. 106.17 p171 (2000).
231. Maaser, K. et al. Extracellular nucleotides inhibit growth of human oesophageal cancer cells via P2Y(2)-receptors. *Br J Cancer* **86**, 636-44. (2002).
232. Janssens, R. & Boeynaems, J.M. Effects of extracellular nucleotides and nucleosides on prostate carcinoma cells. *Br J Pharmacol* **132**, 536-46. (2001).
233. Bradley, K.K. & Bradley, M.E. Purine nucleoside-dependent inhibition of cellular proliferation in 1321N1 human astrocytoma cells. *J Pharmacol Exp Ther* **299**, 748-52. (2001).
234. Hopfner, M. et al. Growth inhibition and apoptosis induced by P2Y2 receptors in human colorectal carcinoma cells: involvement of intracellular calcium and cyclic adenosine monophosphate. *Int J Colorectal Dis* **16**, 154-66. (2001).
235. Tahir, S.A. et al. Development of an immunoassay for serum caveolin-1: a novel biomarker for prostate cancer. *Clin Cancer Res* **9**, 3653-9 (2003).

Az értekezés megírásához felhasznált saját közlemények (*: levelező szerző)

1. ***A. Kittel** I.Miklós, E. Bácsy (1995): Heterogeneous distribution of ecto-ATPases in primary cultures of human adenohipophyseal cells. *Scanning Micr.* 9, 485-492.
2. A.L.Kiss, **A. Kittel** (1995): Early endocytotic step in elicited macrophages: Ω -shaped plasma membrane vesicles at the cell surface. *Cell Biol. Int.* 19 (6) 527-538.
3. ***A. Kittel**, L. Siklós, Gy. Thuróczy, Z. Somosy (1996): Qualitative enzyme-histochemistry and microanalysis reveals changes in ultrastructural distribution of calcium and calcium activated ATPases after microwave irradiation of medial habenula. *Acta Neuropathol* 92: 362-368.
4. E.S. Vizi, S.D. Liang, B. Sperlagh, **A. Kittel**, Zs. Juranyi (1997): Studies on the release and extracellular metabolism of endogenous ATP in rat superior cervical ganglion: Support for neurotransmitter role of ATP. *Neuroscience*, 79, 893-903.
5. ***A. Kittel** (1997): Role of ecto-ATPases, based on histochemical investigations. Evidences and doubts. pages 65-72 in: "Ecto-ATPases: Recent progress on structure and function" Eds. L. Plesner, T. Kirley, A.F Knowles, Plenum Publishing Corporation.
6. Dömötör, E., Sipos, I., **Kittel, A.**, Abbott, N.J. & Adam-Vizi, V. Improved growth of cultured brain microvascular endothelial cells on glass coated with a biological matrix. *Neurochemistry International* 33, 473-8 (1998).
7. ***Á. Kittel**, E. Kaczmarek, J. Seigny, K. Lengyel, E. Csizmadia, S.C. Robson. (1999): CD39 as a caveolar-associated ectonucleotidase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 262 (3) 596-599
8. ***Á. Kittel** (1999): Lipopolysaccharide treatment modifies pH- and cation-dependence ecto-ATPase activity of endothelial cell. *J. Histochem. Cytochem.* 47, 393-400
9. Z. Somosy, **A. Kittel**, G. Thuroczy (1999): Ultrastructural distribution of calcium after ELF modulated microwave and GSM modulated RF irradiation in the temporal cortex of rat brain. In: "Electricity and Magnetism in biology and Medicine", Ed. F Bersani. Kluwer Academic/Plenum Publisher, pp. 601-604.
10. ***A. Kittel**, B. Kalmar, E. Madarasz (2000): Effects of LPS on ecto-ATPase (NTPDase) activity and phagocytosis of cultured astrocytes. pp.. 158-166. In : Ecto-ATPases and Related Ecto-nucleotidases. *Proceedings of the Second International Workshop on Ecto-ATPases and Related Ecto-nucleotidases. June 14-18, 1999, Diepenbeek, Belgium* Eds. L.Vanduffel and R. Lemmens. Publ. Shaker Publishing B.V. Maastricht, The Netherlands
11. B. Kalmár, **A. Kittel**, R. Lemmens, Zs. Környei, E. Madarasz (2000) Cultured astrocytes react to LPS with increased cyclooxygenase activity and phagocytosis. *Neurochem. Int.* 38 453-461
12. K. Koziak, E. Kaczmarek, **A. Kittel**, J. Sévigny, J. K. Blusztajn, J. Schulte am Esch II, M. Imai, O. Guckelberger, C. Goepfert, I. Qawi, S. C. Robson. (2000): Palmitoylation Targets CD39/Endothelial ATP Diphosphohydrolase to Caveolae. *J. Biol. Chem.*, 275(03). 2057.
13. R. Lemmens, **A. Kittel**, E. J. Seigny, L. Vanduffel (2000): Sequencing, cloning and expression of porcine cd39. pp. 69-78. In : Ecto-ATPases and Related Ecto-nucleotidases. *Proceedings of the Second International Workshop on Ecto-ATPases and Related Ecto-nucleotidases. June 14-18, 1999, Diepenbeek, Belgium* Eds. L.Vanduffel and R. Lemmens. Publ. Shaker Publishing B.V. Maastricht, The Netherlands

14. R. Lemmens, L. Kupers, J. Sévigny, A.R. Beaudoin, G. Grondin, **A. Kittel**, E. Waelkens, L. Vanduffel. (2000): Purification, characterization and localization of an ATP diphosphohydrolase in porcine kidney. *Am. J. Physiol. Renal* 278: F978
15. R. Lemmens, L. Vanduffel, **A. Kittel**, A. R. Beaudoin, O. Benrezzak and J. Sévigny (2000) Distribution, cloning and characterization of porcine NTPDase-1. *Eur. J. Biochem.* 267, 4106-4114
16. ***Á. Kittel**, G. Varga, M. Liscovich Ecto-ATPDases and caveolae in multidrug-resistant cancer cells. (2000) *EJN 12 Supp. 11.* 225. 106.17 171
17. ***Á. Kittel**, M. Garrido, G. Varga (2002) Localization of NTPDase1/CD39 in normal and transformed human pancreas. *J. Histochem. Cytochem.* 50 (4) 549-556
18. ***A. Kittel**, J. Pelletier, F. Bigonnesse, .Guckelberger, K. Kordás, N. Braun, S. C. Robson, J. Sévigny (2004): Localisation of nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1 (NTPDase1) and NTPDase2 in pancreas and salivary gland. *J. Histochem. Cytochem.* 52: 861-871
19. K. Sz. Kordás, B. Sperlág, T. Tihanyi, L.Topa, M. C. Steward, G, Varga, **Á.Kittel***(2004): ATP and ATPase secretion by exocrine pancreas in rat, guinea-pig and man. *Pancreas*, 29, 1, 53-60
20. ***Á. Kittel**, Zs. Csapó, É. Csizmadia, S. W. Jackson, S. C. Robson (2004): Co-localization of P2Y1 receptor and NTPDase1/CD39 within caveolae in human placenta. *Eur. J. Histochem.* 48: 253-260
21. ***Á. Kittel**, A. L. Kiss, N. Müllner, I. Matkó, B. Sperlág: Expression of NTPDase1 and caveolins in human cardiovascular disease. *Histochem. Cell Biol.* DOI 10.1007/s00418-005-0018-8

Az értekezésben nem idézett, hasonló metodikákon alapuló saját közlemények:

1. Iwai, E. Masliah, M. Yoshimoto, N. Ge, L. Flanagan, H.A. Rohan de Silva, **A. Kittel**, T. Saitoh (1995): The precursor protein of non-A β component of Alzheimer's disease amyloid (NACP) is a presynaptic protein of the central nervous system. **Neuron**, 14, 467-475.
2. M. Hashimoto, M. Yoshimoto, A. Sisk, L.J. Hsu, M. Sundsmo, **A. Kittel**, T. Saitoh, A. Miller, E. Masliah (1997): NACP, a synaptic protein involved in Alzheimer's disease, is differentially regulated during megakaryocyte differentiation. **Biochem. Biophys. Res. Com.** 237, 611-616
3. N. Komori, **A. Kittel**, D. Kang, D. Shackelford, E. Masliah, J.A. Zivin and T. Saitoh (1997): Reversible ischemia increases levels of Alzheimer amyloid protein precursor without increasing levels of mRNA in the rabbit spinal cord. **Mol. Brain Res.** 49, 103-111
4. **A. Kittel**, N. Komori (1999): Ultrastructural localization of beta-arrestin -1 and 2 in rat lumbar spinal cord. **J. Comp. Neurol.** 412 (4) 649-655
5. Z. Wiener, E. Búzás, P. Kovács, G. Csaba, D. Szabó, **Á. Kittel**, É. Pállinger, T. Watanabe, H. Ohtsu, A. Ichikawa, A. Nagy, A. Falus (2001) Highly reduced peritoneal mast cell number and decreased c-kit expression in histidine decarboxylase knock out mice. **Infalmm. Res.** 50, Suppl. S55-56
6. H.Ohtsu, S. Tanak, T. Terui, Y. Hori, Y. Makabe-Kobayashi, G. Pejler, E. Tchougounova, L. Hellman, M. Gerstsenstein, N. hirasawa, E. Sakurai, E. Buzás, P. Kovács, Gy. Csaba, **Á. Kittel**, M. Okada, M. Hara, L. Mar, K. Numayama-Tsuruta, S. Ishigaki-Suzuki, K. Ohuchi, A. Ichikawa, A. Falus, T. Watanabe, A. Nagy (2001) Mice lacking histidine decarboxylase exhibit abnormal mast cells. **FEBS Lett** 25074 1-4
7. G. Z. Rácz, **Á. Kittel**, D. Riccardi, R. M. Case, A. C. Elliott, G. Varga (2002) The extracellular calcium-sensing receptor in human pancreatic cells. **Gut** 705-711
8. E. Milusheva, M. Baranyi , **Á. Kittel**, Sylvester E. Vizi, B. Sperlág (2005) Increased sensitivity of striatal dopamine release to H₂O₂ upon chronic rotenone. **Free Radical Biology and Medicine**, 39:1 133-142
9. **Á. Kittel**, A. L. Kiss, N. Müllner, I. Matkó, B. Sperlág (2005) Advantage of ultracryo microscopy in the investigation the role of NTPDase 1 and caveolins in the human cardiovascular diseases. **Proceeding book of 7th Multinacional Congress on Microscopy**, Portoroz, Slovenia, June 26-30. Ed. M. Ceh, 145-148
10. Halmos G, Doleviczenyi Z, **Kittel A**, Vizi ES, Lendvai B, Zelles T. (2005) D2 autoreceptor inhibition reveals oxygen-glucose deprivation induced release of dopamine in guinea-pig cochlea, **Neuroscience**, 132: 801-809